

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE MENTAS  
INFECTADAS POR *Puccinia menthae* E *Erysiphe biocellata*

**DANILA MONTE CONCEIÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU-SP  
Setembro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE MENTAS  
INFECTADAS POR *Puccinia menthae* E *Erysiphe biocellata*

**DANILA MONTE CONCEIÇÃO**

Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luis Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração Horticultura.

BOTUCATU-SP  
Setembro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C744c Conceição, Danila Monte, 1982-  
Caracterização histoquímica de folhas de mentas infectadas por *Puccinia menthae* e *Erysiphe biocellata* / Danila Monte Conceição. - Botucatu : [s.n.], 2009. iv, 70 f. : il. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2009  
Orientador: Luis Vitor Silva Sacramento  
Co-orientador: Edson Luis Furtado  
Inclui bibliografia.

1. Histoquímica. 2. Anatomia. 3. Fitopatologia. 4. Controle alternativo. I. Sacramento, Luis Vitor Silva. II. Furtado, Edson Luis. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** "CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE MENTAS  
INFECTADAS POR *Puccinia menthae* E *Erysiphe biocellata*."

**ALUNA:** DANILA MONTE CONCEIÇÃO

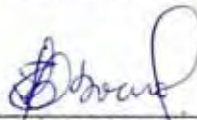
**ORIENTADOR:** PROF. DR. LUÍS VITOR SILVA DO SACRAMENTO  
**CO-ORIENTADOR:** PROF. DR. EDSON LUIZ FURATADO

Aprovado pela Comissão Examinadora



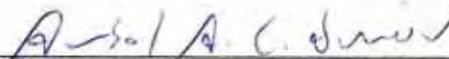
---

PROF. DR. LUÍS VITOR SILVA DO SACRAMENTO



---

PROFª DRª CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO



---

DR. ANÍBAL ALVES DE CARVALHO JÚNIOR

Data da Realização: 30 de setembro de 2009.

*“É impossível avaliar a força que possuímos  
sem medir o tamanho do obstáculo que ela pode vencer,  
nem o valor de uma ação sem sabermos o sacrifício que  
ela comporta”.*  
*(Autor desconhecido)*

***Dedico aos meus pais  
Rubens Cândido da Conceição  
e Maria Helena Monte da Conceição  
pela força, compreensão e exemplos***

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pela força encontrada durante toda trajetória até aqui traçada e às grandes pessoas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais Rubens Cândido da Conceição e Maria Helena Monte da Conceição, pela dedicação, amor e compreensão prestados em toda minha vida, exemplos de força e perseverança.

Aos irmãos Douglas Monte Conceição e Denise Monte Conceição e cunhada Lilian Lopes Devito pela paciência e força.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pela orientação, força, paciência, esperança e aflições divididas durante essa etapa.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado pela co-orientação, paciência e eficiência.

Aos Professores João Domingos Rodrigues, Antônio Ismael Cardoso, Regina Martha Evangelista, Lin Chau Ming, Carlos Gilberto Raetano, e docentes das disciplinas realizadas durante o período de aprendizado, por auxiliarem nos conhecimentos obtidos durante a trajetória acadêmica.

Aos membros da banca examinadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Silvia Fernandes Boaro, Prof. Dr. Aníbal Alves de Carvalho Junior, Prof. Dr. João Domingos Rodrigues e Prof. Dr. Jean Kleber de Abreu Mattos pela disponibilidade e colaboração no aprimoramento deste trabalho.

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".  
(Fernando Pessoa)*

Às eternas companheiras de república: Paola Bocardo, Débora Martinho, Aline Rossi, Manoelle Gullo, Simone Ciavatta, Andréa Carvalho, Susiane Cardoso, Marina Bragion, além de Bryan Takahashi e Hélio Umemura por estarem sempre presentes em momentos que mais precisei, mesmo que muito longe.

Aos grandes amigos: Emi Lorenzetti, pelo trabalho em equipe, companheirismo eterno e viagens furadas, Bárbara Quadros com quem sempre dividi minhas aflições da vida pessoal, Douglas Kohatsu, terno e eterno amigo com quem aprendi muito e Andréa e Ana Paula, pela ajuda e abrigo em Araraquara.

Aos queridos companheiros de mestrado com quem dividi dois anos de alegrias Adilson Pacheco, Camila de Lima Braga, Christian Iezid Maia e Almeida, Erval Rafael Damatto Jr., Felipe

Magro, Luiz Vitor Sanches, Maurício Andrião, Rigléia Brauer, Rosimeire, Thaise Dias e Valdir Zucareli.

Aos tantos outros amigos que, de perto e de longe, acompanharam a trajetória e sempre compartilharam desses momentos: Adriana Tanaka, Aline Rabonato, Fernanda Stela, Juracy Lins, Maria Isabel Mendes, Priscila Castro, Rosilaine Araldi e Francine Vercese.

Aos queridos companheiros Cristiane, Martha e Juan, sempre dispostos a ajudar.

À Maria Angélica Barretto, técnica do Laboratório de Botânica de Araraquara e aos estagiários do Laboratório de Botânica da FCF Camila, Víctor e Luis Antônio, pela amizade, atenção e todo o auxílio nos trabalhos.

Ao pesquisador Dr. Aníbal Alves de Carvalho Junior, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela atenção e na identificação dos fungos.

À Profª. Drª. Carmen Regina Marcati e ao alunos do Laboratório de Anatomia da Madeira da FCA pela cessão do microscópio de captura.

Aos Funcionários da Horticultura e da Defesa Fitossanitária, da Pós-graduação e da Diretoria pelo auxílio por serem atenciosos e me ajudarem sempre que possível.

Aos Funcionários da Fazenda de São Manuel, Nilton, Paschotto, Cido, Lourenço e todos os demais que sempre auxiliaram prontamente nos serviços realizados em campo.

Aos Funcionários do Transporte, Jairo, Bahia, Sérgio, Ricardo e outros, pela atenção e nas idas e vindas em segurança.

Aos Funcionários da Biblioteca, Denise, Solange, Joel e outros pelo ótimo atendimento em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Horticultura) FCA/UNESP, pela oportunidade de realização desta etapa de formação e por todos os conhecimentos adquiridos.

Ao Brasil representado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que de uma forma ou de outra me auxiliaram nas atividades realizadas.

*“Seria maravilhoso não ter que encontrar dificuldades, no entanto da mesma forma que os exames estimulam os estudos de uma pessoa, sem as dificuldades não pode haver progresso ou desenvolvimento. Não agir pelo bem é o mesmo que corresponder ao mal. Não avançar é o mesmo que retroceder. Fugir perante a luta é o mesmo que abandonar a fé. “O desespero é o refúgio dos tolos” - assim diz o ditado. Enquanto mantiverem a esperança, enquanto empreenderem ações corajosas para lutar, podem estar certos de que a primavera irá chegar novamente. Um provérbio russo diz: “Não existe inverno no reino da esperança.” (Daisaku Ikeda).*

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	VI
RESUMO.....	1
SUMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. Aspectos Sócio-econômicos do Gênero <i>Mentha</i> .....	8
2.2. Botânica, Agronomia e Farmacologia do Gênero <i>Mentha</i> .....	9
2.3. Ferrugem da <i>Mentha</i> ( <i>Puccinia menthae</i> ).....	10
2.4. Oídio ( <i>Erysiphe biocellata</i> ).....	12
2.5. Controle de Doenças Fúngicas.....	13
2.6. Controle Alternativo de Doenças.....	14
2.7. Doenças Fúngicas x Anatomia Vegetal.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Inoculação dos Esporos de <i>P. menthae</i> e <i>E. biocellata</i> .....	22
3.2. Avaliação da histoquímica e aspectos anatômicos de folhas de menta infectadas.....	22
3.3. Teste <i>in vitro</i> para a germinação de esporos de <i>P. menthae</i> e <i>E. biocellata</i> .....	25
3.4. Identificação dos Patógenos.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Avaliação da histoquímica de <i>M. piperita</i> , <i>M. spicata</i> , <i>M. suaveolens</i> e <i>M. arvensis</i> infectadas por <i>P. menthae</i> e <i>E. biocellata</i> .....	29
4.1.1. Avaliação da histoquímica de <i>M. piperita</i> infectadas por <i>E. biocellata</i> .....	31
4.1.2. Avaliação da histoquímica de <i>M. arvensis</i> infectadas por <i>E. biocellata</i> e <i>P. menthae</i> .....	34
4.1.3. Avaliação da histoquímica de <i>M. spicata</i> infectadas por <i>P. Menthae</i> .....	39
4.1.4. Avaliação da histoquímica de <i>M. suaveolens</i> infectadas por <i>P. menthae</i> .....	42



4.2. Aspectos anatômicos de <i>M. piperita</i> e <i>M. spicata</i> , <i>M. suaveolens</i> e <i>M. arvensis</i> infectadas por <i>P. menthae</i> e <i>E. biocellata</i> .....	51
4.3. Controle da germinação <i>in vitro</i> de <i>Puccinia menthae</i> e <i>Erysiphe biocellata</i> .....	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
1.	Urediniósporos e Teliósporos de <i>Puccinia menthae</i> .....	28
2.	Esporos de <i>Erysiphe biocellata</i> .....	28
3.	Teste histoquímico com sudan III em secções transversais de folhas de <i>Mentha piperita</i> .....	31
4.	Teste histoquímico com reagente de NADI em secções transversais de folhas de <i>Mentha piperita</i> .....	32
5.	Teste histoquímico com ácido sulfúrico/ glicerina em secções transversais de folhas de <i>Mentha piperita</i> .....	33
6.	Teste histoquímico com sudan III em cortes transversais de folhas de <i>Mentha arvensis</i> .....	35
7.	Teste histoquímico reagente de NADI em cortes transversais de folhas de <i>Mentha arvensis</i> .....	36
8.	Teste histoquímico com tricloreto de antimônio em cortes transversais de folhas de <i>Mentha arvensis</i> .....	37
9.	Teste histoquímico com ácido sulfúrico/ glicerina em cortes transversais de folhas de <i>Mentha arvensis</i> .....	38
10.	Teste histoquímico com sudan III em cortes transversais de folhas de <i>Mentha spicata</i> .....	40
11.	Teste histoquímico com tricloreto de antimônio em cortes transversais de folhas de <i>Mentha spicata</i> .....	41
12.	Teste histoquímico com sudan III em cortes transversais de folhas de <i>Mentha suaveolens</i> .....	43
13.	Teste histoquímico com reagente de NADI em cortes transversais de folhas de <i>Mentha suaveolens</i> .....	45
14.	Teste histoquímico com tricloreto de antimônio em cortes transversais de folhas de <i>Mentha suaveolens</i> .....	46
15.	Teste histoquímico com ácido sulfúrico/ glicerina em cortes transversais de folhas de <i>Mentha suaveolens</i> .....	47
16.	Teste histoquímico de lugol em cortes transversais de folhas de <i>Mentha suaveolens</i> .....	48

**LISTA DE QUADROS E TABELAS**

Quadros		Página
I	Composição química dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon martinii</i> e <i>Corymbia citriodora</i> .....	16
II.	Composição química dos óleos essenciais de <i>Synzygium aromaticum</i> e <i>Citrus limonum</i> .....	17
III.	Reagentes utilizados na metodologia histoquímica.....	24
Tabelas		Página
1.	Resultados referentes aos testes químicos nas espécies sadias.....	29
2.	Resultados referentes aos testes químicos nas espécies lesionadas por <i>E. biocellata</i> em <i>M. arvensis</i> , <i>M. spicata</i> e <i>M. suaveolens</i> .....	30
3.	Resultados referentes aos testes químicos nas espécies lesionadas por <i>P. menthae</i> em <i>M. menthae</i> e <i>M. arvensis</i> .....	30
4.	Porcentagem de esporos germinados de <i>P. menthae</i> e <i>E. biocellata</i> na presença dos óleos essenciais.....	56

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE MENTAS INFECTADAS POR *Puccinia menthae* E *Erysiphe biocellata*.** Botucatu, 2009, 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’.

AUTORA: Danila Monte Conceição

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Luis Furtado

## **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi analisar, de forma comparativa, os efeitos dos fungos *Puccinia menthae* e *Erysiphe biocellata* na anatomia e histoquímica de *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, *Mentha suaveolens* e *Mentha arvensis*, verificar o efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre os fungos e constatar-los como fontes de controle alternativo e averiguar prováveis fatores de resistência às doenças presentes na estrutura anatômica e histoquímica. As plantas foram inoculadas com os esporos dos fungos na face abaxial de suas folhas e submetidas às condições adequadas ao desenvolvimento do patógeno. Após 10 a 15 dias da inoculação, folhas doentes e sadias foram submetidas às análises anatômicas e histoquímicas. Os reagentes empregados para evidenciar as substâncias apolares foram: sudan III para lipídios totais; sulfato azul do nilo para diferenciação de lipídios ácidos e neutros; reagente de NADI para identificação de óleos essenciais e oleoresinas; tricloreto de antimônio para identificação de esteróides e ácido sulfúrico para a identificação de lactonas sesquiterpênicas e para substâncias polares: vanilina clorídrica para a identificação de taninos; lugol para a identificação de amido; e azul brilhante de comassie para identificar proteínas totais. Os testes ‘in vitro’ constaram de óleos essenciais de *Cymbopogon martini*, *Corymbia citriodora*, *Syzygium aromaticum* e *Citrus limonum* nas concentrações 0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04%, além do padrão químico, sobre esporos dos dois patógenos em 4 repetições. Os óleos essenciais foram homogeneizados em meio de cultura ágar-água com Tween 80 e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio os esporos foram inoculados e depois de 24 horas contados de 50 esporos germinados. O estudo anatômico das folhas infectadas por *P.*

*menthae* revelou desestruturação da cutícula, colonização dos tecidos com respostas semelhantes nas quatro espécies estudadas. Para *E. biocellata*, não houve desestruturação da cutícula nem mudanças anatômicas visíveis, mas se constataram os sintomas instalados. O estudo histoquímico identificou a presença de alguns compostos provindos do metabolismo secundário, quando as plantas encontravam-se infectadas pelo patógeno, é o caso de oleoresinas reveladas pelo reagente de NADI e lactonas sesquiterpênicas resultante da reação com ácido sulfúrico/glicerina, e também pelo teste do tricloreto de antimônio revelando produção de esteróides, exceto para *M. piperita*. Os óleos essenciais foram eficientes no controle da germinação dos esporos de ambos os patógenos, exceto pelo óleo essencial de limão, o qual foi menos eficiente na germinação de *P. menthae* e *E. biocellata*. Tanto para *P. menthae* como para *E. biocellata* o melhor controle foi obtido pelo óleo de *C. martini*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Histoquímica, anatomia, fitopatologia, controle alternativo.

**HISTOCHEMISTRY CHARACTERIZATION OF MENTHA'S LEAVES INFECTED BY *Puccinia menthae* AND *Erysiphe biocellata*.** Botucatu, 2009, 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'.

AUTHOR : Danila Monte Conceição

ADSIWER: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

CO-ADSIWER: Prof. Dr. Edson Luis Furtado

### **SUMMARY**

The objective of the study was to analyse, compared the effects of *E. biocellata* and *P. menthae* in the anatomy and in the histochemistry of the mentha species *M. spicata*, *M. piperita*, *M. suaveolens* e *M. arvensis*, to verify the effects of essential oils on the fungi spores as sources of alternative control and to investigate possible resistance factors present in the anatomy and in the histochemistry. The plants were inoculated with the fungi spores in the lower face of the leaf, they were submitted to appropriate conditions for the development of the pathogen. After 10 to 15 days of inoculation, the infected and health leaves were submitted to the anatomic cuts and histochemistry study. The employed reagents to evidence the apolar substances were: sudan III for identify total lipids, blue nilo sulfate for acid and neutral lipids, NADI reagent to identify resins and essential oils, antimony trichloride, to identify steroids and sulphuric acid/glycerine to identify sesquiterpenes lactones. For polar substances were used: vanillin hydrochloric, for identify tannins, lugol, to identify starches and comassie bright blue to identify proteins. The *in vitro* tests consisted in four treatments of essential oils of *Cymbopogon martini*, *Corymbia citriodora*, *Syzygium aromaticum* and *Citrus limonum* in concentrations of: 0%; 0,01%; 0,02%; 0,03% and 0,04%, chemical pattern, in 4 repetition. The essential oils were homogenized in agar-water medium with tween 80 and flowed in Petri plates. After the medium solidification, the spores were inoculated in the medium, by passed 24 hours, the germinated spores were counted. The anatomic study of health menthas, when compared with infected species, with *P. menthae* resulted in cuticule disrupting and tissue colonization, similar in all species. For *E. biocellata* there were no disrupting of the tissues or visible anatomic changes. The histochemistry study identified the presence of some

compounds came from the secondary metabolism when plants were colonized by the pathogens, such as resins from NADI reagent, sesquiterpenes lactones revealed by the reaction with sulphuric acid/glycerine, also by antimony trichloride test, revealing steroids production, except for *M. piperita*, indicating susceptibility. The essential oils were efficient controlling both pathogens, on *in vitro* conditions, except for lemon oil, that was not efficient in both cases. For *P. menthae* and *E. biocellata*, *C. martini* essential oil was the best treatment.

---

**KEYWORDS:** Histochemistry, anatomy, phytopathology, alternative control

## **1. INTRODUÇÃO**

Cada vez mais o conhecimento tradicional a cerca do uso, composição e efeitos das plantas medicinais, assim como seu cultivo e manejo vêm sendo pesquisados para melhor atender uma crescente demanda por plantas medicinais produtoras de substâncias interessantes a indústria farmacêutica, química e alimentícia.

Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde), por volta de 80% da população mundial já utilizaram alguma espécie medicinal, destes, 30% foram por meio de indicações médicas. A própria OMS incentiva o uso de plantas medicinais visando diminuir o número de excluídos pelo sistema de saúde de cada país, por levantamentos regionais das plantas, estímulo do uso de produtos de eficácia comprovada, desaconselhamento do uso de produtos sem efeito ou prejudiciais à saúde, desenvolvimento de programas de cultivo e utilização de plantas selecionadas em preparações eficazes, seguras e de qualidade (LORENZI & MATOS, 2008). Segundo Yunes e Calixto (2001) cerca de 25% dos fármacos utilizados em países industrializados provém, direta ou indiretamente, de



produtos naturais, sendo grande parte deles de vegetais superiores. Estes fármacos são oriundos, em sua maioria, de pesquisas científicas orientais (China, Coréia, Japão) (YUNES e CALIXTO, 2001).

No Brasil os principais estados produtores de plantas medicinais são Paraná, São Paulo, Bahia, Maranhão, Amazonas, Pará e Mato Grosso (SILVA et al., 1998). O Paraná sozinho é responsável pela movimentação anual de R\$ 25 milhões com um total de 40000 toneladas produzidas em 3 mil hectares, e apresenta crescimento anual de 10% (SEAB, 2005; RODRIGUES, 2007). O mercado brasileiro de fitomedicamentos atingiu, em 2001, cerca de US\$ 270 milhões, correspondendo a 5,9 % do mercado brasileiro de medicamentos (CALIXTO, 2003). Nas últimas décadas houve um aumento no mercado de fitomedicamentos, principalmente em países industrializados, atingindo cerca de US\$ 20 bilhões anuais. Os países europeus, asiáticos e os Estados Unidos são os principais consumidores deste setor (CALIXTO, 2003).

O avanço da produção de plantas teve como consequência principal a perda de suas características naturais de rusticidade, implicando em maior suscetibilidade a estresses nutricionais e hídricos e menor resistência a pragas e doenças (JUNIOR et al., 2005). O levantamento e o conhecimento do manejo de doenças em plantas medicinais são escassos no Brasil e o gênero *Puccinia* surge como um dos gêneros de maior número de registros (URBEN, 1987; LORENZETTI, 2009). Lima (2002) identificou e descreveu 30 doenças provocadas por fungos da família *Pucciniaaceae* em plantas medicinais incluindo menta (*Mentha* spp.), erva cidreira (*Lippia alba*), cordão-de-frade (*Leonotis nepetaefolia*), arnica paulista (*Porophyllum ruderale*) e fáfia (*Pfaffia glomerata*).

Em qualquer cultivo o manejo de plantas exige cada vez mais cuidados fitossanitários nas culturas. À medida que se acentua a disseminação do uso de plantas medicinais na saúde, a preocupação com controle de doenças e o uso de defensivos em seu cultivo torna-se cada vez maior. Não existe legislação específica para o limite de resíduos nessas culturas. Em virtude da gama de substâncias utilizadas no combate de pragas e doenças, torna-se cada vez mais difícil a identificação dessas moléculas na matéria fresca e no óleo essencial. O acúmulo desses resíduos no produto final pode acarretar sérios danos à saúde e ao meio ambiente (ZUIN & VILEGAS, 2000).

Plantas possuem resistência natural ao ataque de patógenos. Células vegetais reagem por meio de mecanismos estruturais ou bioquímicos, visando sua defesa (MATIELLO et al., 1997). As inter-relações entre os fungos fitopatogênicos e as plantas são de interesse mundial, uma vez que a humanidade depende da utilização de espécies vegetais para sua sobrevivência. Fungos exercem relações com seus hospedeiros adaptando-se às mudanças de genótipo e até mesmo de condições ambientais adversas, pois apresentam rápido ciclo de vida e facilidade de liberação de novas combinações genéticas de patogenicidade, devido às mutações espontâneas (MATIELLO et al., 1997).

Poucos são os estudos sobre as relações entre plantas medicinais e fitopatógenos. Plantas medicinais são geralmente resistentes, pois possuem amplos arranjos de componentes de defesa e bloqueio físico, porém se em condições de desequilíbrio nutricional e se associadas à expansão da cultura, podem apresentar susceptibilidade à pragas e doenças (BARBIERI & CARVALHO, 2001; LIMA et al., 2004; JUNIOR et al., 2007). Os mecanismos de defesa contra microrganismos são desencadeados imediatamente após a percepção de sua presença nos tecidos e uma série de reações de reconhecimento resulta em modificações morfológicas, histoquímicas e fisiológicas (MUSSURY et al., 2007).

A técnica histoquímica surge como recurso para a identificação de compostos existentes nas plantas, e está baseada no uso de reagentes cito e químico-histológicos previamente recomendados. Seus métodos baseiam-se em reações cromáticas utilizadas para o reconhecimento da natureza química das membranas e do conteúdo celular, sendo assim considerado um método de análise qualitativa dos componentes celulares, tais como proteínas, lipídeos e elementos iônicos presentes no conteúdo celular (DORES, 2007).

Com este trabalho objetivou-se analisar, de forma comparativa, os efeitos dos fungos *Puccinia menthae* e *Erysiphe biocellata* na anatomia e histoquímica de *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, *Mentha suaveolens* e *Mentha arvensis* e verificar a ação de óleos essenciais de plantas medicinais sobre os fungos, com a finalidade de constatar seus efeitos para estudos futuros como fontes de controle alternativo, averiguando prováveis fatores de resistência às doenças presentes na estrutura anatômica e histoquímica das espécies.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos sócio-econômicos do gênero *Mentha*

A ordem Lamiales é uma das maiores ordens botânicas existentes. Inclui oito famílias, das quais se destaca a Lamiaceae, que possui 252 gêneros e cerca de 6700 espécies no mundo todo, sendo que grande parte delas são espécies de valor medicinal (DI STASI et al., 2002). Menta é o nome comum de aproximadamente 25 espécies do gênero *Mentha*, originária da Europa, Ásia e Península Arábica (LORENZI & MATOS, 2008).

Mentas são conhecidas geralmente pelo potencial aromático de suas folhas, compõem um pequeno grupo, geralmente híbrido, como é o caso da *Mentha spicata x suaveolens*. Os híbridos são geralmente estéreis e se reproduzem assexuadamente por rizomas. Entre eles *Mentha viridis* L. (hortelã verde); *Mentha rotundifolia* H.B.K. (mentrasto); *Mentha citrata* Ehrh. (menta-do-levante); *Mentha crispa* L. e *Mentha arvensis* L., ricas em óleo e mentol; e por fim a *Mentha piperita* L. que é a mais popular e refrescante das hortelãs (BRUGNERA et al., 1999; MARTINS, 2002).

O uso na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, de tabaco pela sua ação antifúngica e antibacteriana, conferem à menta grande importância econômica. Além disso, a produção mundial de seu óleo essencial, concentrada nos Estados Unidos, garante o mercado desta espécie (GARDINER, 2000). Segundo Silva et al. (1998), as mentas estão entre as diversas espécies medicinais brasileiras mais importadas por países como a Alemanha, os Estados Unidos e os Países Baixos.

Devido à exigência em fertilidade e água, a cultura da menta se estabeleceu principalmente em terras recém desmatadas do Brasil principalmente no estado do Paraná e São Paulo, e em 1936 começou a ser produzida em escala industrial (CZEPAK, 1998). Durante a 2ª Guerra Mundial, o Brasil passou a ter importância mundial na produção de óleo essencial de hortelã. Nesse período, o país participava de mais de 60% da produção mundial, sendo o estado do Paraná responsável por 95% da produção brasileira. Após este período, houve uma queda na produção de óleo devido a alguns fatores, como: criação do mentol sintético de igual ação de menor custo; suscetibilidade da cultura à ferrugem (*Puccinia menthae*) (BRUGNERA et al., 1999); diminuição das áreas de desbravamento e baixo nível tecnológico do produtor (CZEPAK, 1998). Atualmente Estados Unidos é o país líder de produção de óleo essencial de menta, sendo que as folhas e o óleo essencial de *M. piperita* são oficializados no U.S. National Formulary. Na Alemanha a *M. piperita* é uma das ervas mais importantes economicamente sendo licenciada como chá medicinal e oficializada na Farmacopéia Alemã (PUSHPANGADAN & TEWARI, 2006).

## **2.2 Botânica, agronomia e farmacologia do gênero *Mentha***

O gênero *Mentha* pertence à família Lamiaceae. É uma planta perene, herbácea, rizomatosa, de porte baixo (0,3 - 0,4 m), de hastes ramificadas, aéreas e quadrangulares, de coloração verde. As folhas são simples, opostas, de base ovalada e ápice agudo, com nervuras curtas e salientes e apresentam glândulas secretoras de óleo essencial abundantes. O gênero apresenta inflorescência espiciforme e terminal, com aproximadamente 15 cm de comprimento, com florescimento de junho a outubro (CASTRO & CHEMALE, 1995). As características morfológicas variam de acordo com as várias espécies.

São propagadas por meio de rizomas ou estacas, mais propriamente de ramos subterrâneos, devendo ser replantados a cada seis meses para garantir o rendimento e alta qualidade (LORENZI & MATOS, 2008). São de fácil cultivo e no plantio definitivo, o espaçamento deve ser de 0,6 m x 0,4 m. Preferencialmente cultivadas em países de clima temperado ou subtropical, não toleram geadas ou calor excessivo, a temperatura ideal está entre 18 e 24°C. As espécies são exigentes em água, requerem solos permeáveis, ricos em matéria orgânica e pH neutro (CASTRO & CHEMALE, 1995).

A menta possui monoterpenos, ácido caféico, flavonóides e taninos, os quais conferem os efeitos medicinais (GARDINER, 2000). Dependendo de sua fase de desenvolvimento e das condições ambientais fornecidas, as mentas apresentam teores variáveis de seus principais compostos mentol, mentona, isomentona e neomentol, entre outros, como descrito por Di Stasi et al. (2002).

As folhas, por possuírem estruturas secretoras de óleo essencial, conferem à hortelã as propriedades tônica, antiespasmódica, antiinflamatória, antiúlcera e antiviral, além de calmante, estimulante e carminativa, digestiva, estomativa, utilizadas mais comumente na forma de infuso (LORENZI & MATOS, 2008). Incluem também indicações para flatulências, timpanite, catarros, vômitos, verminoses, problemas do fígado, anti-séptico, cólera, insônia, dores de cabeça e musculares e atividades fungicidas. De acordo com Di Stasi et al. (2002) altas doses de mentol podem provocar inibição da sensibilidade, sonolência e estímulo da secreção de mucosas nazais e bucais.

### **2.3 Ferrugem da menta (*Puccinia menthae*)**

As ferrugens, em geral, possuem potencial devastador sobre o hospedeiro. Provocam grandes danos sobre as plantas e perdas em produção, atingindo culturas como milho, trigo, cevada, além de plantas ornamentais, frutíferas e hortaliças. O fungo promove redução do processo fotossintético tanto pela perda de nutrientes como pela destruição da área foliar. Formam lesões amareladas de aspecto ferruginoso, constituído por estruturas reprodutivas do patógeno, as quais emergem do tecido vegetal e rompem a epiderme do hospedeiro. São parasitas obrigatórios e não apresentam fase saprofítica, bastante

evoluídos, colonizam o hospedeiro intercelularmente e produzem haustórios, que retiram nutrientes das células vivas. Possuem relação hospedeiro-patógeno específica e pode ocorrer em nível de espécie ou variedade da mesma espécie (BEDENDO, 1995a).

Doenças podem causar sérios danos e interferir no metabolismo da planta afetando sua qualidade e assim baixando seu valor final. De acordo com Edwards et al. (1999), as plantas infectadas pela ferrugem da menta podem reduzir o rendimento em massa fresca e prejudicar a qualidade final do óleo essencial produzidos por folhas maduras de menta (mais prejudicadas pela doença), pois a infecção ocasiona sua queda. Estudos realizados por Horner (1954) demonstraram que a infecção em *Mentha piperita* por *Puccinia menthae* reduziu a produção de ramos laterais, rizomas e causou 30% de perda do conteúdo de óleo de folhas infectadas.

A ferrugem da menta, cujo agente causal é a *Puccinia menthae*, é a principal doença da cultura e um fator limitante da produção, especialmente nas regiões Sul e Sudeste (SANTOS et al., 2005). O gênero *Puccinia* pertence a Puccinaceae, Uredinales, Uredinomyces, Basidiomycota, Fungi (KIRK et al., 2001) um dos mais importantes gêneros em termos econômicos e agrônomicos (LIMA et al., 2004). Segundo Edwards et al. (1999), a ferrugem da menta foi primeiramente encontrada na Europa em 1801. Como sintomas observa-se inicialmente com lesões alaranjadas brilhantes marcando a folhagem da planta. Depois a folha adquire coloração amarela, seguida de escurecimento, crestamento e queda (SANTOS et al., 2005).

Existem relatos da ocorrência do patógeno em *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* no Estado de São Paulo e Distrito Federal (MENDES et al., 1998; URBEN et al., 1987). A ferrugem infecta geralmente as espécies *Mentha spicata* e *Mentha gracilis*, com reduzida ocorrência em épocas mais quentes do ano (JOHNSON, 1995). Mendes et al. (1998) registram a ocorrência de *P. menthae* em *M. arvensis*, *Mentha* sp., *M. canadensis*, *M. piperita* e *M. spicata*.

## 2.4 Oídio (*Erysiphe biocellata*)

Os agentes causais de oídios são fungos Ascomicetos pertencentes à Ordem Erysiphales, dos gêneros *Erysiphe*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* e *Uncinula*, comuns de regiões tropicais. O gênero *Oidium* corresponde à fase anamórfica, responsável pela ocorrência da doença em condições tropicais, nesta fase o fungo produz hifas claras e septadas, que dão origem a conidióforos e conídios. Os conídios germinam em ambiente úmido, e os tubos germinativos penetram nos tecidos vegetais diretamente por meio dos estômatos (BEDENDO, 1995b; LOPEZ & RIVERA, 2001).

Como sintomas típicos apresentam eflorescência branca e pulverulenta, que recobre as partes aéreas das plantas. Essa eflorescência é formada por estruturas do patógeno, o micélio, conidióforos e conídios. Observada mais frequentemente na face adaxial das folhas, pode ser constatada também na face abaxial (BEDENDO, 1995b). São fungos parasitas obrigatórios e podem conviver com a planta durante todo o ciclo de vida da mesma, sem ocasionar sua morte. Possuem parasitismo refreado e elevada especificidade na relação patógeno-hospedeiro (BEDENDO, 1995b).

Este fungo afeta ampla gama de espécies e diminuem a produtividade dos hospedeiros, provocam aparecimento de áreas cloróticas, e necróticas, atacam preferencialmente folhas adultas, formam haustórios no interior das células do hospedeiro, mas não causam sua morte (LOPEZ & RIVERA, 2001; STADNIK & MAZZAFERA, 2001).

O oídio no gênero *Mentha* foi primeiramente constatado por Koike (1999) em plantas de *Mentha spicata* na costa da Califórnia – EUA na qual se observou o crescimento de uma massa fúngica branca nas folhas e ramos, e o patógeno foi identificado como *Erysiphe orontii* Cast. No Brasil Zauza et al. (2003) identificaram em Viçosa – MG, o patógeno *Erysiphe biocellata* em folhas de *Mentha arvensis*, a qual apresentava uma massa esbranquiçada, contendo as estruturas do fungo. Russomanno et al. (2005), também relataram a ocorrência de oídio em plantas de *Mentha piperita*, contendo conidióforos de *Oidium asteris-punicei*, cuja forma telemórfica corresponde ao *Erysiphe cichoracearum* DC. As plantas apresentavam sinais de infecção por lesões necróticas, que avançaram até seca total das folhas infectadas não ocasionando a morte da planta. Tozze Jr. et al. (2006) também

observaram a doença em plantas da espécie *Mentha x villosa*, concentrando-se em folhas baixas, ocasionando amarelecimento e crestamento foliar.

Devido à sua recente introdução poucos são os estudos considerando a interferência do patógeno na produção de óleo essencial, massa fresca e seca, níveis fotossintéticos, assim como estratégias de penetração do patógeno nas estruturas das plantas em nossas condições.

## 2.5 Controle de doenças fúngicas

Os métodos de controle de doenças variam consideravelmente dependendo do tipo de patógeno, do hospedeiro e da sua interação entre eles. Os métodos de controle visam preferencialmente proteger a planta antes que ocorra a infecção (AGRIOS, 1997).

O controle das doenças fúngicas pode ser realizado com fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos, defensivos de contato que permanecem na superfície da planta até serem degradados ou lavados pela chuva ou abrasão. Apresentam baixa persistência no solo e possuem meia vida no campo de 1 a 7 dias (GARLAND, 2004). De acordo com Holland et al. (1994) fungicidas ditiocarbamatos degradam-se em etilenotioreia, composto altamente cancerígeno, e permanecem como resíduos nas culturas.

Em *Mentha*, o controle das doenças é realizado mais comumente com o fungicida Mancozeb (BRUGNERA et al., 1999), utilizado especialmente contra a ferrugem (*Puccinia menthae*), principal patógeno relacionado ao gênero (LIMA, 2002), e no controle da Cercosporiose (*Cercospora menthicola*), comum em *Mentha piperita* (MENDES et al., 1998). O Mancozeb possui amplo espectro de ação e é comumente utilizado no cultivo de plantas para extração de óleos para indústria com a finalidade controlar diversas doenças fúngicas em plantas. Esse fungicida faz parte do grupo dos ditiocarbamatos.

Testes realizados por Starr et al. (1963) indicam que o uso de fungicidas em plantas de menta pode deixar resíduos tóxicos no óleo essencial. Ensaios sugerindo limites de metais impactantes são descritos nas farmacopéias, porém, não existem ensaios para defensivos e por este motivo, são utilizadas as normas que vigoram para os



alimentos (SHARAPIN, 2001). Os defensivos podem interferir em maior ou menor extensão na biossíntese de compostos secundários, modificando a porcentagem de componentes ativos da planta (ZUIN & VILEGAS, 2000).

Entretanto controle de doenças fúngicas na agricultura é feito geralmente através do uso extensivo de defensivos agrícolas, que alcança 60 a 70% das doenças de plantas cultivadas, os quais são responsáveis por efeitos indesejados ao meio ambiente, principalmente contaminação dos recursos naturais.

## **2.6 Controle alternativo de doenças**

Fatores como inóculo inicial, taxa de progresso da doença e tempo de exposição da doença, podem fornecer informações para adaptar as medidas de controle que devem ser aplicadas à respectiva doença. Dessa forma, são adotados os “princípios de controle de doenças” ou “princípios de Whetzel”, que propõe 6 princípios associados para o controle da doença: exclusão, erradicação, imunização, proteção, terapia e escape, sendo que estes 6 princípios devem ser integrados de forma a aumentar a eficiência do controle da doença, sem a necessidade de tratamentos químicos pesados (MAFFIA & MIZUBUTI, 2005).

O novo modelo de produção orgânica imposto pelo mercado, visando diminuir os impactos de defensivos sobre o ambiente, requer a elaboração de produtos e dessa forma, vem sendo estudados caldas, biofertilizantes e extratos. Princípios ativos de plantas, resultantes do metabolismo secundário, são fontes de substâncias potencialmente antifúngicas. Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas agem de forma específica em sua defesa, atração ou repulsão de outros organismos (SILVA et al., 2005b). Dentre os metabólitos sintetizados pela planta podemos citar os óleos essenciais que encontram maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos representando uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos (CHAGAS, 2009).

Segundo Shwan-Estrada et al. (2000), o controle alternativo pode ser realizado por meio de controle biológico e indução da resistência das plantas, sendo que esta envolve o tratamento das plantas com agentes bióticos ou abióticos para ativar mecanismos de defesa das plantas. Essa alternativa no manejo das culturas resulta na redução da dependência

de produtos químicos além de outros insumos energéticos e maior uso de processos biológicos nos sistemas agrícolas.

Dentre as espécies estudadas a palmarosa (*Cymbopogon martini*) é originária da Índia e conhecida pelo seu potencial antifúngico e atividade repelente, cujo óleo essencial apresenta como composto majoritário o geraniol (Quadro I), variando a composição entre 38 a 97%, de acordo com a variedade (BARD et al., 1988; SAHOO & DUTTA, 1982; SCHERER, 2008).

A espécie *Corymbia citriodora* pertence à família Myrtaceae, originária da Austrália, seu óleo essencial contém de 50 a 100 compostos orgânicos voláteis e apresentam atividade fungitóxica, dentre os compostos majoritários estão o citronelal e o citronelol (Quadro I) (ABREU, 2006). Salgado et al. (2003) trabalhando com *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Botrytis cinerea* Pers. e *Bipolaris sorokiniana* Sacc. verificaram a ação fungitóxica de *E. urophylla*, *C. citriodora* e *E. camaldulenses*. Rodrigues et al. (2006) também observaram a ação fungitóxica do extrato bruto aquoso de *C. citriodora* sobre esporos de *Helminthosporium* sp.

O limão (*Citrus limonum*) é originário de regiões tropicais e subtropicais da Ásia e pertence à família Rutaceae (ABREU, 2006). De acordo com Caccioni et al. (1998) óleos essenciais do gênero *Citrus* demonstraram efeito sobre o fungo *Penicillium italicum* e *P. digitatum*. Chagas (2009) verificou que se comparados com os óleos de *C. citriodora*, *Azadirachta indica*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Cymbopogon martini* o óleo essencial de *C. limonum* foi menos eficiente. O limão possui como compostos majoritários o limoneno e o mircenol (Quadro II).

Pertencente à família Myrtaceae, o cravo-da-Índia (*Synzygium aromaticum*), tem como centro de origem a Malásia. Seu óleo essencial possui o eugenol como principal componente (Quadro II), muito valorizado no mercado farmacêutico e industrial (ABREU, 2006). Autores como Ponce et al. (2003) constataram que a concentração de 0,04 a 0,05 mL/100 mL, foi suficiente para inibição do crescimento de bactérias pelo método mínimo de concentração. Souza et al. (2004) também demonstrou ação nas concentrações de 200; 400; 600 e 800 µg/mL., para inibição de *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*.

Quadro I. Composição química dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* e *Corymbia citriodora*:

<b>Espécie</b>	<b>Composição</b>	<b>Quant. (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Cymbopogon martinii</i>	trans-ocimeno	1,45	Abreu (2006); Scherer (2008); Chagas (2009)
	geraniol	86,98	Abreu (2006); Scherer (2008); Chagas (2009)
	geranial	0,41	Abreu (2006); Scherer (2008); Chagas (2009)
	acetato de geranila	9,03	Abreu (2006); Scherer (2008); Chagas (2009)
	trans-cariofileno	0,63	Abreu (2006); Chagas (2009)
	butanoato de geranila	0,15	Scherer (2008)
	<i>cis</i> -Ocimeno	0,15	Scherer (2008)
	$\beta$ -Mirceno	0,08	Scherer (2008)
	$\beta$ -Cariofileno	0,86	Scherer (2008)
	Total	99,74	
<i>Corymbia citriodora</i>	$\alpha$ -pipeno	0,45	Abreu (2006); Chagas (2009);
	$\beta$ -pipeno	0,68	Abreu (2006); Chagas (2009);
	limoneno	0,33	Abreu (2006); Chagas (2009);
	1,8-cineol	1,51	Abreu (2006); Chagas (2009);
	isopulegol	5,18	Abreu (2006); Chagas (2009);
	citronelal	74,74	Abreu (2006); Chagas (2009); Estanislau et al. (2001)
	isso-isopulegol	4,33	Abreu (2006); Chagas (2009);
	citronelol	6,26	Abreu (2006); Chagas (2009);
	geraniol	2,96	Abreu (2006); Chagas (2009);
	acetato de citronelila	1,24	Abreu (2006); Chagas (2009);
	acetato de geranila	0,28	Abreu (2006); Chagas (2009);
	trans-cariofileno	0,72	Abreu (2006); Chagas (2009);
	3- neotujamol	6,78	Estanislau et al. (2001)
	Isodiidrocaveol	0,43	Estanislau et al. (2001)
Total	100		

Quadro II. Composição química dos óleos essenciais de *Synzygium aromaticum* e *Citrus limonum*:

<b>Espécie</b>	<b>Composição</b>	<b>Quant. (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Synzygium aromaticum</i>	eugenol	82,55	Abreu (2006)
	trans-cariofileno	11,98	Abreu (2006)
	$\alpha$ -humuleno	1,74	Abreu (2006)
	acetato de genila	3,30	Abreu (2006)
	$\alpha$ -copaeno	0,59	Abreu (2006)
	Total	99,99	
<i>Citrus limonum</i>	triciclono	0,33	Abreu (2006)
	$\alpha$ -pineno	1,61	Abreu (2006)
	$\beta$ -pineno	1,75	Abreu (2006)
	mirreno	10,68	Abreu (2006)
	gama-2-careno	1,98	Abreu (2006)
	para-cimeno	0,28	Abreu (2006)
	limoneno	72,49	Abreu (2006)
	gama-terpineno	8,06	Abreu (2006)
	terpinoleno	0,28	Abreu (2006)
	neral	0,49	Abreu (2006)
	geranial	0,89	Abreu (2006)
	$\alpha$ -transbergamoteno	0,36	Abreu (2006)
	Total	99,2	

Vários trabalhos comprovam ação fungitóxica direta de compostos de plantas medicinais capazes de reduzir o crescimento micelial, inibir a germinação de esporos e induzir a produção de fitoalexinas (SHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Substâncias voláteis, como óleos essenciais, produzidas por plantas medicinais possuem um forte potencial de interação com o meio. Podem apresentar atividades repelentes ou atraentes e mesmo tóxicas a microrganismos e insetos. São os casos de substâncias como  $\alpha$ -pípenos e  $\beta$ -pípenos presentes em óleo de resina de pinheiro (*Pinus sp.*), o nerol extraído do óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), o limoneno do óleo da casca de *Citrus* (laranja, limão), eugenol do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), o mentol presente em hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), entre outros compostos (SAITO, 2004).

## 2.7 Doenças fúngicas x anatomia e histoquímica vegetal

As plantas apresentam um complexo de componentes de defesa contra patógenos, por outro lado os patógenos também produzem uma série de componentes de resistência, por isso as plantas são suscetíveis a um grande número destes patógenos. Devido a gama metabólica em que, por um lado, a planta tenta se proteger do fungo e por outro lado o fungo tenta quebrar esta proteção, surgem processos evolutivos constantes, resultando, ao final, em alto grau de especificidade de relação. Com isso o contato entre patógeno e hospedeiro desencadeia uma série de reações de reconhecimento que podem resultar em modificações morfológicas (BARBIERI & CARVALHO, 2001; SILVA et al., 2005a; MUSSURY et al. 2007).

Plantas adaptadas a ambientes desfavoráveis possuem estruturas tais como a redução do tamanho das folhas, o aumento da quantidade de tricomas, estômatos profundos, acúmulo de mucilagem e o aumento da compactação do mesofilo. Os sistemas de defesa da planta contam com dois tipos de fatores de resistência, fatores pré-formados e fatores pós-formados. Os fatores pré-formados incluem fatores que a planta normalmente já possui como cutícula, tricomas, estômatos, fibras e vasos; fenóis, alcalóides, fototoxinas, entre outros. Os fatores pós-formados são substâncias ausentes ou presentes em baixos níveis e ativados após a infecção, tais como papilas, halos, lignificação, tiloses, fitoalexinas (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

De forma geral, esses dois fatores podem ocorrer de duas formas, como barreiras estruturais ou reações bioquímicas, impedindo a entrada ou o crescimento do patógeno (AGRIOS, 2005). A presença de cutícula, fator pré-existente nas folhas das plantas, pode surgir como alternativa na proteção, entretanto a taxa de proteção dependerá da sua espessura e composição. Por outro lado o patógeno pode produzir enzimas que podem hidrolizar a cutina e outros podem penetrar mecanicamente a camada cuticular e as paredes das células epidérmicas (DICKISON, 2000; SILVA et al., 2005a).

O tipo de células e a organização dos tecidos parenquimáticos também podem refletir mecanismos de defesa eficientes contra patógenos (SILVA et al., 2005a). Infecções em tecidos vegetais resultam em mudanças permanentes ou transitórias na

estrutura das células. Essas mudanças são produzidas diretamente pelo parasita ou resultam da resposta de defesa da planta, sendo não-específica, geral ou específica para o patógeno, resultando em mudanças celulares previsíveis e bem definidas (DICKISON, 2000).

A principal resposta anatômica a infecções e ferimentos na planta é a formação de uma parede na região infectada a fim de conter os danos em uma pequena área dentro de um único tecido, restringindo o movimento do patógeno. Esta compartimentalização da infecção pode ocorrer em áreas isoladas em toda planta. Sua sobrevivência depende da capacidade de regenerar as áreas infectadas e formar novos tecidos (DICKISON, 2000). A resposta bioquímica da planta ao ataque do patógeno se deve às moléculas elicitoras resultantes da percepção da infecção; proteínas de defesa são sintetizadas e são responsáveis pela inibição do desenvolvimento do patógeno, digerindo as paredes celulares do fungo, através da biossíntese de compostos antimicrobianos ou através da fortificação das paredes celulares da planta (BARBIERI & CARVALHO, 2001).

A técnica histoquímica de identificação de compostos presentes em vegetais é baseada no uso de reagentes cito ou químico-histológicos previamente estabelecidos e visa identificar compostos do metabolismo primário e secundário de plantas presentes nos tecidos vegetais, tais como compostos fenólicos, ligninas, taninos, flavonóides, cumarinas, alcalóides, açúcares, aminoácidos. Auxiliam também na determinação da composição e idade de materiais fossilizados e ainda na composição botânica de misturas vegetais e farmacêuticas (DORES, 2007). O reconhecimento de estruturas histoquímicas nos vegetais possibilita e facilita o manejo ecológico e mais econômico das doenças propiciando maior produção e qualidade dos produtos vegetais (DORES, 2007).

Compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas são sintetizados com maior frequência quando em situações de estresse. Plantas defendem-se de patógenos e insetos por meio de mudanças bioquímicas. A célula vegetal pode reagir com inúmeras estratégias de defesa, dentre elas as estruturais como cutina, suberina, lignina, celulose, e proteínas da parede celular, ou ainda barreiras bioquímicas (AGRIOS, 2005). Uma vez reconhecida a molécula elicitora do patógeno pela planta, segue-se uma série de reações bioquímicas e mudanças estruturais, num esforço de deter o patógeno e defender a planta, sendo ativados genes de alerta das plantas, resultando na síntese de compostos e no aumento

da atividade enzimática, importantes para defesa das plantas, formando barreias estruturais e compostos tóxicos que resultam no atraso da infecção (SILVA et al., 2008) .

Os métodos histoquímicos estão fundamentados nas reações cromáticas para o reconhecimento de substâncias de membranas e conteúdo celular. São análises mais qualitativas do que quantitativas dos componentes celulares. A histoquímica vegetal distingue dois grupos de compostos lipofílicos (polares), lipídios totais, insaturados, ácidos graxos, terpenóides (óleos, resinas e lactonas sesquiterpênicas) e compostos hidrofílicos (apolares), sendo estes fenólicos, amidos, taninos, alcalóides, entre outros (PEARSE, 1960; GERSBACH, 2002; DORES, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Botânica do Departamento de Produtos Naturais e Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara e no Laboratório de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Campus de Botucatu. A inoculação das plantas e subsequente manutenção das plantas foram realizadas no Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Produção Vegetal – Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônomicas, da UNESP, Campus de Botucatu. As coordenadas geográficas do local estão à 22° 52' 55'' de latitude sul e 48° 26' 22'' a oeste de Greenwich, com altitude de aproximadamente 830 m.

Foram utilizadas plantas das espécies *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Mentha suaveolens* e *Mentha arvensis*, cultivadas em vasos com solo autoclavado na proporção 2:1 (solo: matéria orgânica), foram mantidas durante 3 a 4 meses em casa de vegetação até o momento da inoculação dos esporos dos fungos. Foram realizadas análises comparativas e testes histoquímicos em secções transversais de folhas associadas à infecção com os fungos *Puccinia menthae* e *Erysiphe biocellata*, além do controle *in vitro* dos esporos dos fungos.



### **3.1 Inoculação dos esporos de *P. menthae* e *E. biocellata***

Para inoculação dos esporos dos fungos, foi obtida uma suspensão de esporos de ambos os fungos, coletados em folhas de plantas infectadas e mantidas na estufa do Departamento de Produção Vegetal – Defesa Fitossanitária. Os esporos foram obtidos por meio de lavagem de 20 folhas infectadas com auxílio de um pincel macio (número 30) e água destilada. Após a obtenção dos esporos adicionou-se aproximadamente 20 mL de água destilada para formar a suspensão de esporos. Procedeu-se a contagem dos esporos desta suspensão em câmara de contagem hemacitômetro de Neubauer, resultando em aproximadamente  $3 \times 10^5$  esporos por mililitro de solução de *P. menthae* e  $2 \times 10^5$  esporos por mililitro de solução de *E. biocellata*. Após a contagem as suspensões foram pinceladas nas faces abaxial e adaxial de folhas do terço médio dos ramos aéreos (hastes).

As plantas foram acondicionadas em câmara úmida climatizada em temperatura de 18 a 21 °C (ZAUZA et al., 2003; MAY et al., 2008), com fotoperíodo de 8 horas de luz, durante 24 a 48 horas para infecção das plantas. Após esse período, os vasos contendo as plantas inoculadas foram removidos para a estufa onde, depois do período de infecção (aparecimento dos primeiros sintomas, que ocorreu depois de 10 a 15 dias após inoculação), as folhas foram coletadas para a etapa posterior.

### **3.2 Avaliação da histoquímica e aspectos anatômicos das folhas de mentas infectadas**

O estudo anatômico de folhas infectadas foi realizado após a confirmação da presença dos sintomas típicos de ambas as doenças, que variou em cada espécie.

Foram coletadas folhas adultas e totalmente desenvolvidas, o material colhido foi mantido sob refrigeração por cerca de 2 horas em isopor com gelo e posteriormente encaminhado ao laboratório para realização das secções transversais. As secções foram feitas à mão, com a ajuda de navalha de aço inoxidável, no terço médio das

folhas sadias bem como para as infectadas, neste último caso no local de ocorrência das lesões.

As secções transversais foram submetidas à coloração com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 (KRAUS & ARDUIN, 1997) e montadas em glicerina em lâminas de vidro, procedendo-se o estudo anatômico com o auxílio de microscópio de luz Axiskop 40 Zeiss com captura de imagens Axio Cam MRC e com o Programa Axiovision 4.6.3.0, do Departamento de Ciências Ambientais – Ciências Florestais da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu.

Para o estudo histoquímico as secções foram submetidas aos reagentes descritos. Como controle para identificação de substâncias apolares, as secções foram tratadas por 10 minutos em cada passagem de uma série etanólica 25%, 50%, 75% e 100% e cetônica (50% em etanol e 100%), seguida de reidratação gradual (LEWINSOHN et al., 1998). Como controle para identificação de substâncias polares, as secções foram tratadas com banho em solução comercial de hipoclorito de sódio (máximo 2% de cloro ativo) por 15 minutos, seguido de 3 banhos consecutivos em solução aquosa de ácido acético (1:500).

De acordo com Kraus e Arduin (1997), os testes usados nos estudos anatômicos para o reconhecimento de metabólitos celulares, em geral, reagem a mais de uma substância, gerando a necessidade de testes complementares, com controle, para garantir correta interpretação. Em razão dessa recomendação, foram realizadas com três repetições para cada substância, sendo considerados passíveis de testes complementares aqueles compostos determinados por apenas uma reação de coloração.

De acordo com as recomendações de Ascensão (2003) para identificação de substâncias polares e apolares, segue a metodologia utilizada para cada um dos reagentes empregados (Quadro III).

Quadro III. Reagentes utilizados na metodologia histoquímica:

<b>Reagentes</b>	<b>Grupo de compostos</b>	<b>Teste Histoquímico</b>	<b>Coloração</b>
<b>Apolares</b>	<b>Lipídios</b>	<b>sudan III</b>	<b>vermelho</b>
		<b>sulfato azul do nilo</b>	<b>azul- rosa</b>
	<b>Óleos essenciais e Resinas</b>	<b>reagente de NADI</b>	<b>vermelho escuro púrpura</b>
	<b>Esteróides</b>	<b>tricloreto de antimônio</b>	<b>vermelho-alaranjado</b>
	<b>Lactonas</b>	<b>ácido sulfúrico/ glicerina</b>	<b>vermelho-acastanhado</b>
<b>Polares</b>	<b>Taninos</b>	<b>vanilina clorídrica</b>	<b>vermelho intenso</b>
	<b>Amido</b>	<b>lugol</b>	<b>roxo</b>
	<b>Proteínas</b>	<b>azul brilhante de comassie</b>	<b>azul claro</b>

Para substâncias polares foram empregados os reagentes:

1. Sudan III (JOHANSEN, 1940): as secções foram submetidas à uma solução saturada de vermelho Sudan III (30%) durante 15 minutos à temperatura ambiente, em seguida passaram por rápida lavagem em etanol 70% e lavagem rápida em água. As secções foram montadas em lâminas com glicerina 30%

2. Sulfato azul do nilo (CAIN, 1947): as secções foram submetidas à uma solução de Sulfato azul do nilo a 1% durante 5 minutos a 60°C, em seguida lavados em ácido acético a 1% durante 1 minuto a 60°C e lavados rapidamente em água. As secções foram montadas em lâminas com glicerina 30%

3. Reagente de NADI (DAVID & CARDE, 1964): as secções foram submetidas à solução de reagente de NADI durante 1 hora no escuro, em seguida os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 durante 2 minutos. As secções foram montadas em lâminas com glicerina 30%

4. Tricloreto de antimônio (HARDMAN & SOFOWORA, 1972; MACE & HOWELL, 1974): as secções foram submetidas à uma solução saturada de tricloreto

de antimônio em ácido perclórico a 60% à temperatura ambiente. As secções foram montadas diretamente em lâminas no reagente e observadas depois de 3 a 10 minutos.

5. Ácido sulfúrico/glicerina: para detecção das lactonas sesquiterpênicas, adotou-se o procedimento descrito por HIGUCHI (2007), que obteve melhores resultados ao modificar a proposta de Geissman e Griffin (1971), que ao utilizar solução concentrada de ácido sulfúrico, que em alguns casos, não possibilita a visualização do material em estudo após período de tempo maior, uma vez que as estruturas celulares se desintegram rapidamente. Higuchi (2007) recomenda a reação com uma solução de ácido sulfúrico concentrado:glicerina a 50% (1:1). Os cortes foram montados diretamente na lâmina em solução de ácido sulfúrico 50% em glicerina.

Para substâncias polares foram empregados:

6. Vanilina clorídrica (MACE & HOWELL, 1974): as secções foram submetidas à uma solução de vanilina 0,5% em ácido clorídrico 9% durante 10 minutos e a montagem em lâmina feita em ácido clorídrico 9%.

7. Lugol (JENSEN, 1962): as secções foram submetidas à uma solução de lugol durante 5 a 10 minutos e posteriormente lavados em água. As lâminas foram montadas em glicerina 30%

8. Azul brilhante de comassie (FISCHER, 1968): as secções foram submetidas a uma solução de azul brilhante de comassie R250 a 0,25% em ácido acético a 7% durante 10 minutos à quente (60°C). As secções foram montadas em lâminas com glicerina 30%

### **3.3 Teste *in vitro* para a germinação de esporos de *P. menthae* e *E. biocellata* na presença de óleos essenciais**

A avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais *in vitro* consistiu de quatro diferentes óleos essenciais: palmarosa (*Cymbopogon martini*), eucalipto (*Corymbia citriodora*), cravo (*Syzygium aromaticum*) e limão (*Citrus limonum*) em 4 diferentes doses de cada um deles: 0,01%, 0,02%, 0,03% e 0,04%; além do tratamento com

padrão químico de controle (Mancozeb) na concentração 0,2%; e água, como tratamento testemunha.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo 'Clevenger', utilizando 200 g de folhas de palmarosa, eucalipto e limão e de sumidades floridas de cravo, secos em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 40 °C até peso constante (SIMÕES et al., 1999). O material permaneceu em hidrodestilação por aproximadamente 90 minutos sendo posteriormente retirado o óleo essencial separado.

Os esporos foram obtidos de folhas infectadas plantas de *M. spicata* e *M. arvensis* e retirados das folhas por meio de pincelamento, juntamente com a água destilada formou-se a suspensão de esporos. Preparou-se um meio de cultura ágar-água, submetido à autoclavagem durante 20 minutos à temperatura de 120 °C. Quando o meio de cultura encontrava-se em temperatura de fusão (aproximadamente 50 °C), adicionaram-se, sob agitação, os óleos essenciais juntamente com o tween 80, sendo posteriormente vertidos em placa de Petri. Após solidificação do meio de cultura a suspensão de esporos foi inoculada ao meio utilizando uma pipeta automática com uma alíquota conhecida de 20 µL. Após a inoculação, as placas foram encaminhadas para B.O.D na ausência de luz e temperatura constante de aproximadamente 24 °C, durante um período de 24 horas.

Foram contados de 50 a 100 esporos no campo ótico do microscópio e considerados esporos germinados aqueles que apresentaram a emissão dos tubos germinativos superiores ao diâmetro dos esporos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições e analisado em programa estatístico SISVAR, versão 5.1 (Build 72).

### **3.4 Identificação dos Patógenos**

Amostras dos ramos de menta (*M. spicata*, *M. arvensis* e *M. suaveolens*) com folhas contendo os sintomas de ambas as doenças, foram amostradas, preservadas e secas em estufa de circulação forçada a 40 °C, durante 48 horas. As excisatas foram montadas e enviadas aos cuidados do Dr. Aníbal Alves de Carvalho Junior, no Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, para os procedimentos de identificação e tambamento dos esporos e dos patógenos.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar a sintomatologia das doenças nas plantas 10 a 15 dias após a inoculação e verificar que para *P. menthae* apenas as espécies *M. spicata*, *M. arvensis* e *M. suaveolens* manifestaram os sintomas da doença. Para *E. biocellata* apenas as espécies *M. piperita* e *M. arvensis* apresentaram os sintomas referentes a esse fungo. Cultivares da mesma espécie podem apresentar células com diferentes densidades, compactação e espessura de parede celular no parênquima paliçádico indicando diferenças na interação com microrganismos, ou seja, podem conferir resistência (SILVA et al., 2005a). Tais fatores podem estar ligados à variabilidade genética das espécies utilizadas.

De acordo com a identificação obtida pelo pesquisador Dr. Aníbal Alves de Carvalho Junior, no Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, os fungos contidos nas lesões e os esporos presentes nas folhas de *Mentha spicata*, *Mentha suaveolens* e *Mentha arvensis* foram identificados como as estruturas pertencentes às espécies *Puccinia menthae* e *Erysiphe biocellata*. Na figura 1 observam-se as estruturas do patógeno *Puccinia menthae* (urediniosporos e teliosporos). A Figura 2 mostra os elementos de identificação dos esporos e das estruturas do patógeno *Erysiphe biocellata*.

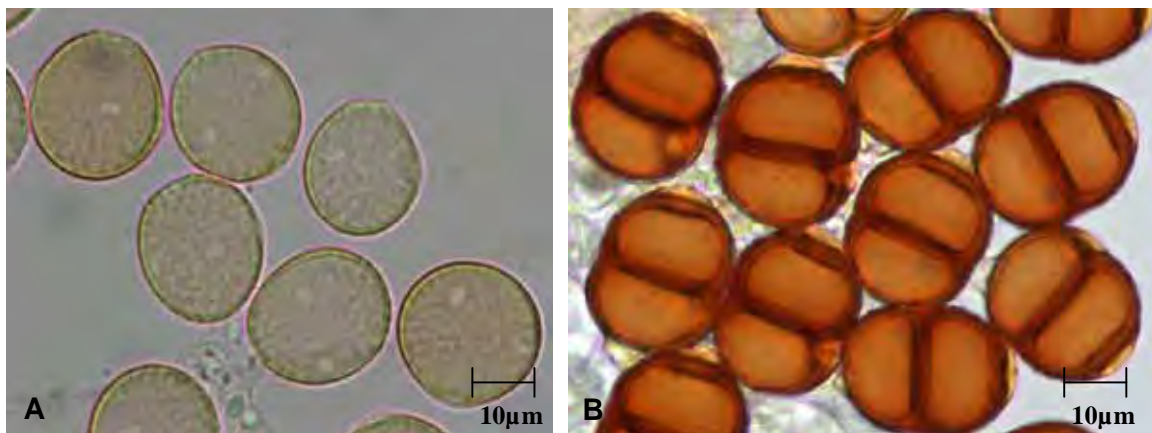


Figura 1. Urediniósporos (A) e Teliósporos (B) de *Puccinia menthae*. Foto: Carvalho Jr. (2008).



Figura 2. Esporos de *Erysiphe biocellata*. Esporos do fungo (A) e Estruturas (B). Foto: Carvalho Jr. (2008).

**4.1 Avaliação da histoquímica de *M. piperita*, *M. spicata*, *M. suaveolens* e *M. arvensis* infectadas por *P. menthae* e *E. biocellata***

As tabelas 1, 2 e 3 apresentam os resultados referentes aos testes histoquímicos realizados com cada uma das espécies e seus respectivos patógenos.

Tabela 1. Resultados referentes aos testes histoquímicos e os grupos de compostos a que pertencem, nas plantas sadias.

Grupo de Compostos	Teste Histoquímico	Espécies			
		<i>M. piperita</i>	<i>M. arvensis</i>	<i>M. spicata</i>	<i>M. suaveolens</i>
Lipídios	sudan III	+	+	+	+
	sulfato azul do nilo	+	+	+	+
Óleos essenciais e Resinas	reagente de NADI	-	-	-	-
Esteróides	tricloreto de antimônio*	+	+	+	+
Lactonas	ácido	+	-	-	-
Sesquiterpênicas	sulfúrico/glicerina	+	-	-	-
Taninos	vanilina clorídrica	-	-	-	-
Amido	lugol	-	-	-	+
Proteínas	azul brilhante de comassie	+	+	+	+

\*Testes positivos em tricomas glandulares



Tabela 2. Resultados referentes aos testes histoquímicos e os grupos de compostos a que pertencem, em espécies lesionadas por *P. menthae* em *M. arvensis*, *M. spicata* e *M. suaveolens*.

Grupo de Compostos	Teste Histoquímico	Espécies		
		<i>M. arvensis</i>	<i>M. spicata</i>	<i>M. suaveolens</i>
Lipídios	sudan III	+	+	+
	sulfato azul do nilo*	+	+	+
Óleos essenciais e Resinas	reagente de NADI <sup>1</sup>	+	+	+
Esteróides	tricloreto de antimônio	+	+	+
Lactonas	ácido	+	+	+
Sesquiterpênicas	sulfúrico/glicerina	+	+	+
Taninos	vanilina clorídrica	-	-	-
Amido	lugol	-	-	-
Proteínas	azul brilhante de comassie	+	+	+

\*Positivo para lipídios ácidos; <sup>1</sup>Positivo para ácidos resínicos

Tabela 3. Resultados referentes aos testes histoquímicos e os grupos de compostos a que pertencem nas espécies lesionadas por *E. biocellata* em *M. piperita* e *M. arvensis*.

Grupo de Compostos	Teste Histoquímico	Espécies	
		<i>M. piperita</i>	<i>M. arvensis</i>
Lipídios	sudan III	+	+
	sulfato azul do nilo*	+	+
Óleos essenciais e Resinas	reagente de NADI <sup>1</sup>	+	+
Esteróides	tricloreto de antimônio	+	+
Lactonas	ácido sulfúrico/glicerina	+	+
Sesquiterpênicas	ácido sulfúrico/glicerina	+	+
Taninos	vanilina clorídrica	-	-
Amido	lugol	-	-
Proteínas	azul brilhante de comassie	+	+

<sup>1</sup>Positivo para ácidos resínicos; \*Positivo para lipídios ácidos

#### 4.1.1 Avaliação da histoquímica de *M. piperita* infectadas por *E. biocellata*

O teste de sudan III foi positivo tanto para folhas saudias como para folhas infectadas pelo patógeno (Tabelas 1 e 3). Observou-se concentração de lipídios na superfície foliar em regiões mais próximas à epiderme quando as folhas estavam infectadas (Figura 2). Em células epidérmicas, este fato pode ser um indicativo do consumo dos lipídeos totais da planta pelo patógeno, ou ainda acúmulo de tais compostos na superfície foliar. De acordo com Agrios (2005) plantas que produzem exsudados na superfície das folhas podem favorecer o crescimento e germinação de esporos através do fornecimento de nutrientes (como aminoácidos e açúcares).

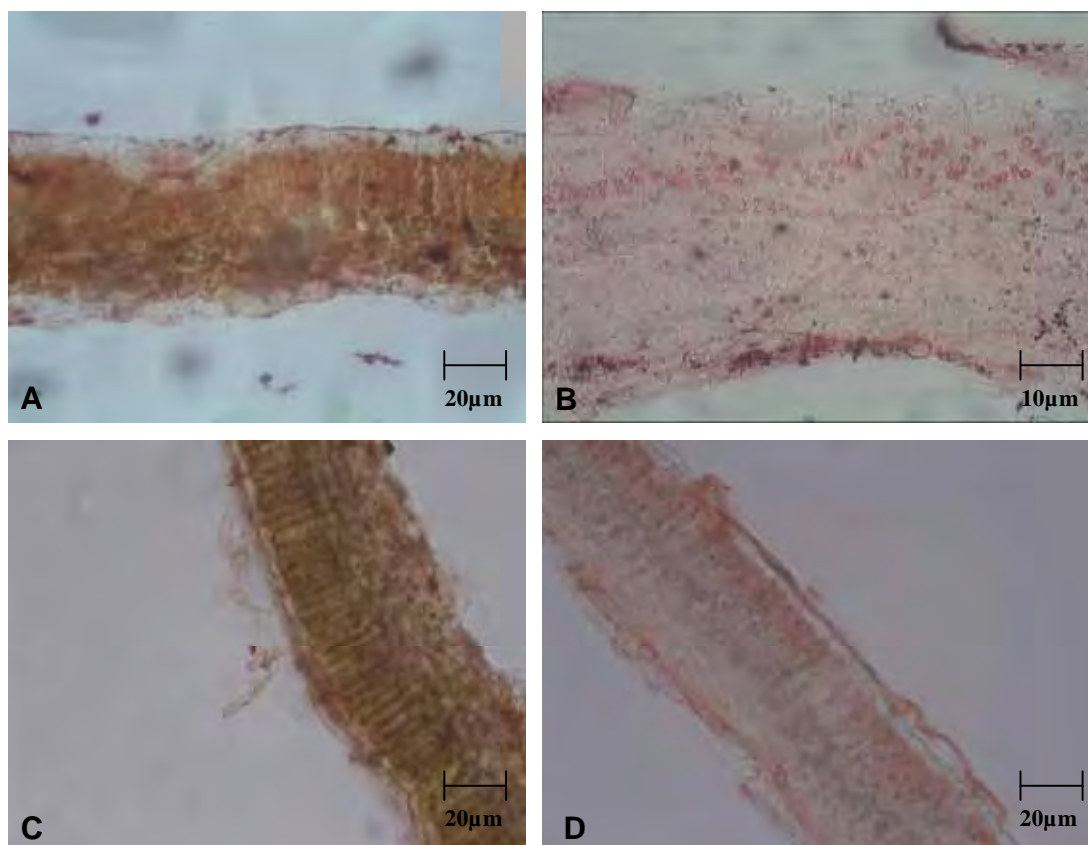


Figura 3. Teste histoquímico com sudan III em secções transversais de folhas de *Mentha piperita*. Figuras A/B: secção transversal de folhas saudias; C/D: secção transversal de folhas infectadas com *E. biocellata*; seta: hifas do patógeno. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste sulfato azul do nilo foi positivo para folhas sadias, indicando coloração rosa para lipídeos neutros em pêlos glandulares, e coloração azul como para lipídeos ácidos (Tabelas 1 e 3). A distribuição da coloração azul em folhas sadias foi uniforme em todo o perfil da secção transversal. A ausência de lipídios neutros em secções contendo o patógeno pode indicar a drenagem desses lipídios, representando grande fonte de nutriente.

O teste do reagente de NADI (Figura 4) foi positivo para folhas infectadas e negativo para folhas sadias (Tabelas 2 e 3).

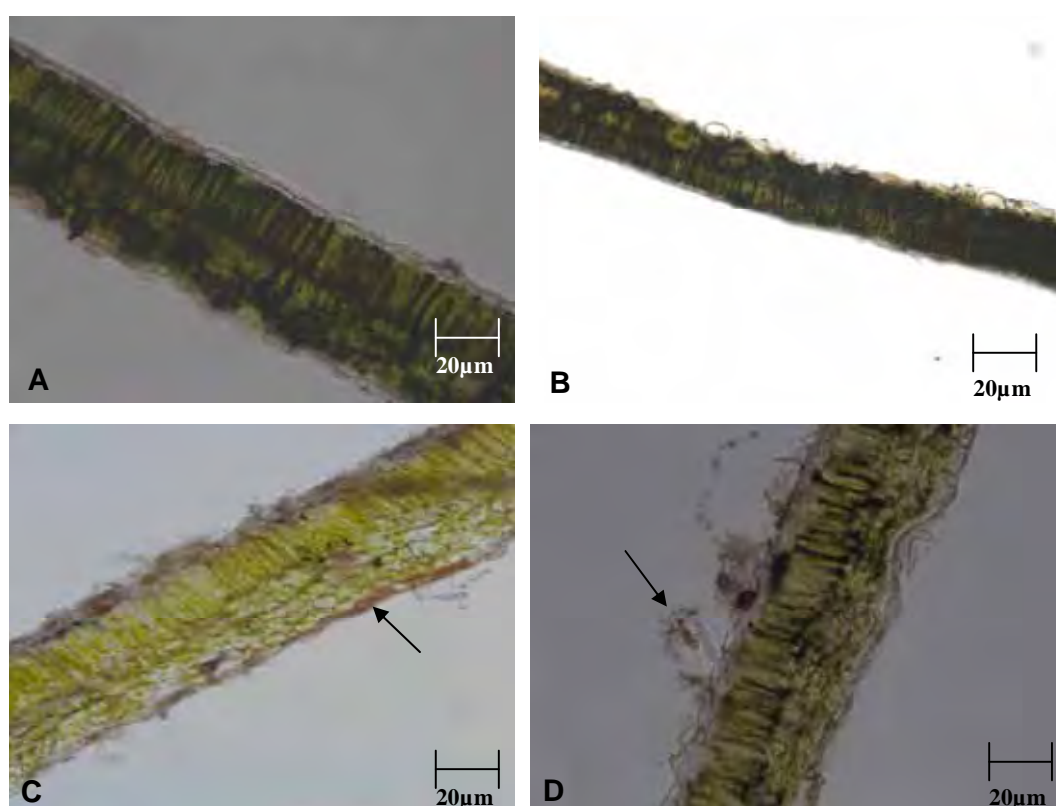


Figura 4. Teste histoquímico com reagente de NADI em secções transversais de folhas de *Mentha piperita*. Figuras A/B: secção transversal de folhas sadias; C/D: secção transversal de folhas infectadas com *E. biocellata*; seta: em C coloração resultante da reação; seta: em D: hifas do patógeno. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste de tricloreto de antimônio foi positivo em folhas sadias e em folhas infectadas apresentaram coloração vermelho-alaranjado em tricomas glandulares. Este fato indica que a infecção pelo fungo não alterou a produção de esteróides pela planta (Tabelas 1 e 3).

O teste do ácido sulfúrico/ glicerina (Figura 5) foi positivo em folhas sadias e infectadas pelo fungo (Tabelas 1 e 3). Nas folhas sadias, o teste revelou coloração vermelho-acastanhado apenas em pêlos glandulares localizados na superfície adaxial das folhas, quando infectadas as folhas apresentam a mesma coloração na superfície da folha, próximas à cutícula, e não necessariamente nos pêlos glandulares. Este fato indica maior síntese de lactonas sesquiterpênicas quando os tecidos são atacados pelo patógeno. Arantes (2007) estudando síntese e avaliação de toxicidade de lactonas sesquiterpênicas, concluiu que tais substâncias podem ser responsáveis por ação herbicida, possuem amplo espectro de atividade biológica, sua forte atividade citotóxica pode estar relacionada com a defesa das plantas contra insetos e patógenos.

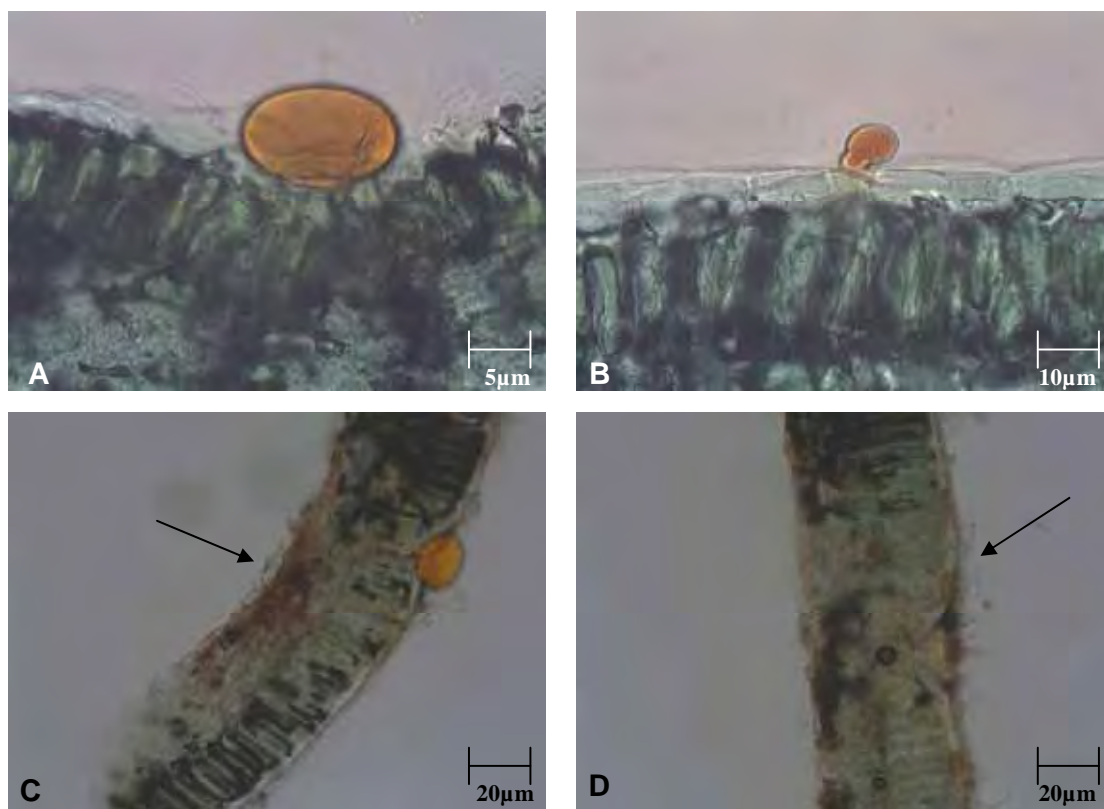


Figura 5. Teste histoquímico com ácido sulfúrico/ glicerina em secções transversais de folhas de *Mentha piperita*. Figuras A/B: secção transversal de folhas sadias; seta: coloração em tricomas glandulares; C/D: secção transversal de folhas infectadas com *E. biocellata*; seta: em C coloração resultante da reação; seta: em D: hifas do patógeno. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste da vanilina clorídrica foi negativo tanto em folhas sadias como em folhas infectadas pelos fungos (Tabelas 1 e 3).

O teste do lugol foi negativo para folhas sadias e para folhas infectadas (Tabelas 1 e 3). As secções transversais de folhas infectadas não apresentaram a presença de amido em suas estruturas.

O teste para o azul brilhante de comassie foi positivo tanto em folhas infectadas como em folhas sadias (Tabelas 1 e 3). A coloração azul foi observada nas regiões mais externas, ou seja, próximas à epiderme, incluindo o micélio do fungo, o qual se mostrou bem instalado sobre o tecido. Proteínas são os principais componentes dos tecidos, tanto animais como vegetais, dessa forma é possível identificar tais compostos com facilidade em todos os tecidos encontrados na figura, como também podem estar ligadas ao sistema de defesa das plantas. Não é possível dessa maneira limitar a especificidade, origem e função das proteínas identificadas, pois seriam necessários testes específicos relacionados aos tipos de proteínas existentes na planta, uma vez que estas podem exercer diferentes funções.

#### **4.1.2 Avaliação da histoquímica de *M. arvensis* infectadas por *E. biocellata* e *P. menthae***

O teste de sudan III (Figura 6) em folhas de *M. arvensis* foi positivo (Tabelas 1 e 2). As secções transversais de folhas sadias indicam a presença de lipídios totais distribuídos uniformemente tanto no parênquima paliçádico como no parênquima lacunoso, em toda secção transversal (coloração vermelha). Quando infectadas por *P. menthae* observa-se acúmulo de coloração vermelha na base da colônia formada pelo fungo. Neste caso, a infecção já instalada revela que os lipídios totais identificados pelo reagente, servem de fonte direta de energia para os fungos. Diferentemente do ocorrido com *E. biocellata* não houve concentração de lipídeos logo abaixo da colonização dos tecidos, mas a distribuição destes no corte continuou uniforme, neste caso pode-se inferir que neste caso o fungo não utilizou os lipídios como fonte de energia.

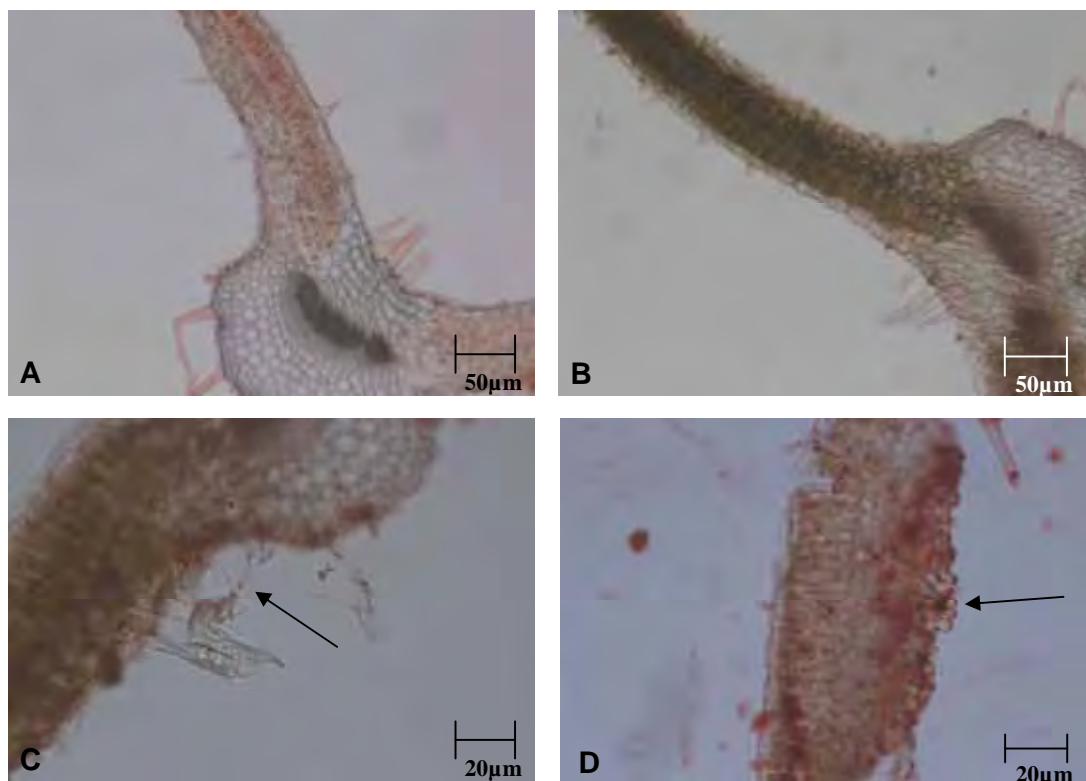


Figura 6. Teste histoquímico com sudan III em secções transversais de folhas de *Mentha arvensis*. Figuras A/B: secção transversal de folhas sadias; C: secção transversal de folhas infectadas com *E. biocellata*; seta: em hifas do patógeno; D: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; seta: colônia de fungos em coloração vermelha na base. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste do sulfato azul do nilo foi positivo em folhas sadias tanto para lipídios ácidos como para lipídios neutros (Tabelas 1, 2 e 3). A coloração azul prevaleceu em toda secção transversal contendo *E. biocellata* e não apresentou coloração rosa em nenhuma localização, ou seja, foi negativo para lipídios neutros. Quanto às folhas infectadas por *P. menthae* observou-se que a colônia formada pelos esporos do fungo, apresentou leve coloração azul. Agrios (2005) afirma que tal fato pode indicar o consumo de lipídios neutros pelos fungos ou ainda indicar uma reação bioquímica da planta como resposta de defesa.

O teste com reagente de NADI (Figura 7) foi negativo para folhas sadias (Figura 6). Nos casos de folhas infectadas por *P. menthae* e *E. biocellata* o reagente indicou resultados positivos (Tabelas 1, 2 e 3), mostrando leve coloração

avermelhada em células da epiderme onde ocorreu a infecção pelos patógenos. A coloração avermelhada nas células pode ser um indicio e reação bioquímica à presença do patógeno (DI STASI, 1995; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

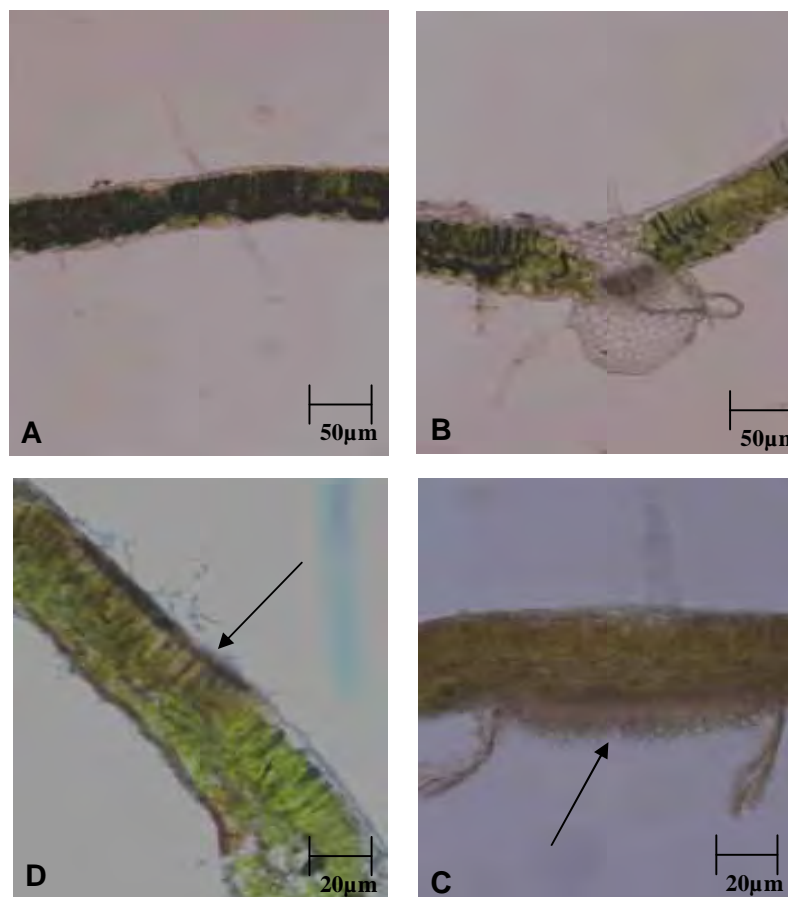


Figura 7. Teste histoquímico com reagente de NADI em secções transversais de folhas de *Mentha arvensis*. Figuras A/B: secção transversal de folhas saudáveis; C: secção transversal de folhas infectadas com *E. biocellata*; seta: coloração resultante da reação; D: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; seta: colônia de fungos. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste de tricloreto de antimônio foi positivo (Figura 8) apresentando coloração vermelho-laranja nos pêlos glandulares em folhas saudáveis e infectadas (Tabelas 2, 3 e 4). Em folhas infectadas por *E. biocellata* a coloração tem intensidade aumentada nas células epidérmicas indicando maior síntese e concentração de esteróides. De acordo com Fumagali et al. (2008) esteróides podem



agir na proteção das plantas contra outros organismos ou condições que causem prejuízos à planta.

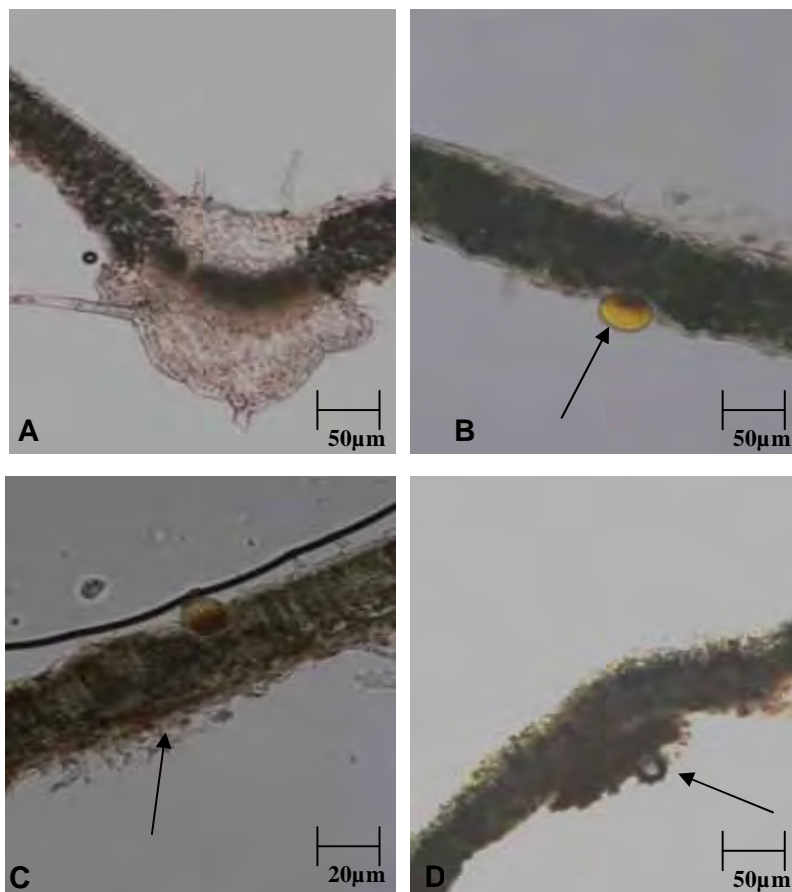


Figura 8. Teste histoquímico com tricloreto de antimônio em secções transversais de folhas de *Mentha arvensis*. Figuras A/B: secção transversal de folhas saudáveis; seta: em B coloração resultante da reação em tricoma glandular; C: secção transversal de folhas infectadas com *E. biocellata*; seta: coloração resultante da reação em células epidérmicas; D: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; seta: colônia de fungos. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste do ácido sulfúrico/ glicerina (Figura 9) foi negativo para folhas saudáveis e positivo para folhas infectadas com *P. menthae* e *E. biocellata* apresentando colorações vermelho-acastanhado próximos à superfície das folhas onde ocorre a infecção (Tabelas 1, 2 e 3). O teste que identifica lactonas sesquiterpênicas foi positivo em folhas infectadas para ambas as doenças, em virtude da maior sintetização desses compostos como resposta à infecção. De acordo com Arantes (2007) e Carvalho



et al. (2009) tais compostos estão ligados às respostas às atividades biológicas a que as plantas são submetidas. Possuem forte atividade citotóxica, e podendo estar relacionadas ao sistema de defesa das plantas. Substâncias depositadas no interior dos tecidos da epiderme tais como resinas, látex, gomas, carboidratos, ligninas, géis e tiloses e ácidos fenólicos complexos podem agir como sistemas de defesa contra patógenos (MATIELLO et al., 1997).

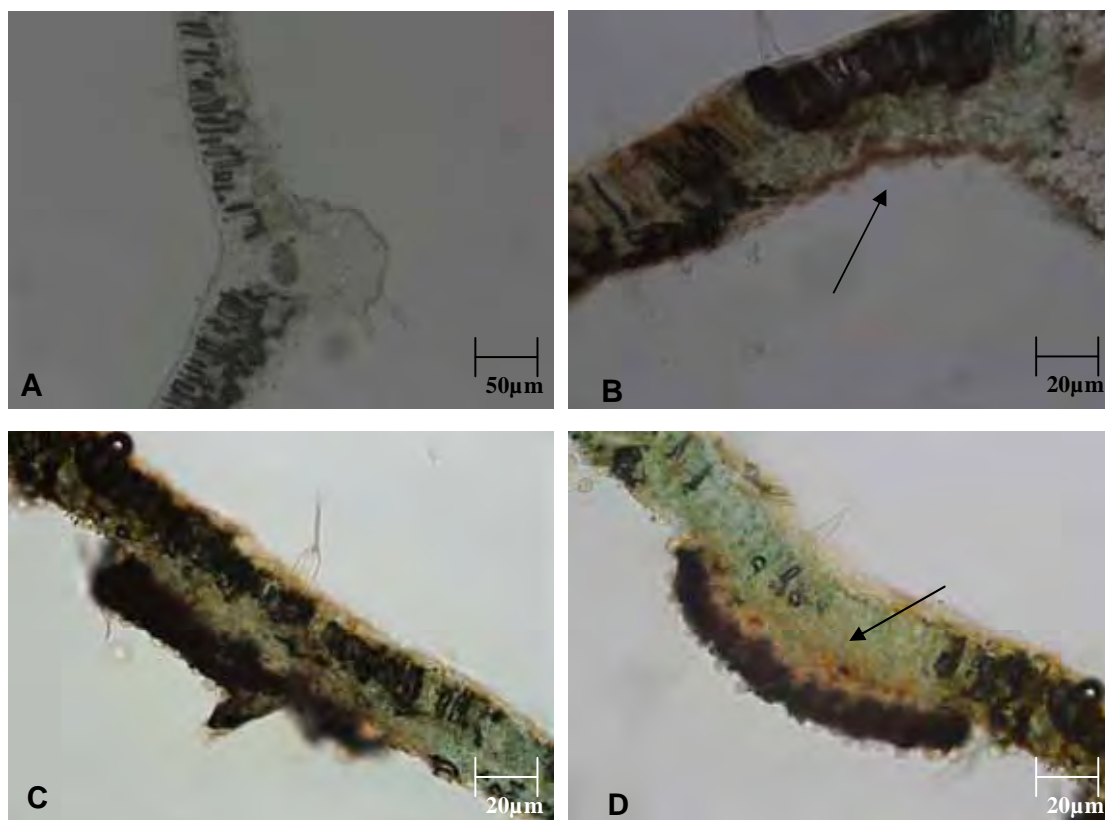


Figura 9. Teste histoquímico com ácido sulfúrico/ glicerina em cortes transversais de folhas de *Mentha arvensis*. Nas figuras A: Folhas saudáveis; B: Folhas infectadas com *E. biocellata*; no destaque coloração indicativa da reação nas células epidérmicas; e C/D: Folhas infectadas com *P. menthae*; seta: coloração na base da colônia. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste com vanilina clorídrica foi negativo em todos os casos (Tabelas 1, 2 e 3).

O teste de lugol os resultados foram negativos tanto em folhas saudáveis como em folhas infectadas pelos patógenos (Tabelas 1, 2 e 3) não identificando a presença de amidos, resultando em coloração roxa característica do reagente.

O teste do azul brilhante de comassie foi positivo, indicando coloração azul nos tecidos (Tabelas 1, 2 e 3).

#### 4.1.3 Avaliação histoquímica de *M. spicata* infectadas por *P. menthae*

O teste do sudan III foi positivo (Tabelas 1 e 2). Em folhas sadias há distribuição da coloração vermelha, indicando a presença de lipídios totais em todo o mesofilo foliar (Figura 10). Os testes em folhas infectadas revelam, principalmente no controle, uma grande aglomeração de pigmentação vermelha logo na base da colônia dos fungos.



Figura 10. Teste histoquímico com sudan III em cortes transversais de folhas de *Mentha spicata*. Nas figuras A/B: folhas sadias; C: folhas infectadas com *P. menthae*; no destaque coloração indicativa da reação nas células epidérmicas; e D: folhas infectadas com *P. menthae*; seta: para a coloração da colônia. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste do sulfato azul do nilo foi positivo para lipídios ácidos (coloração azul) e neutros (coloração rosa) em folhas sadias de *M. spicata* (Tabelas 1 e 2). No caso de folhas infectadas o teste foi positivo para lipídios ácidos, revelando coloração azul em todo o mesofilo foliar.

O teste do reagente de NADI foi negativo para folhas sadias. Em folhas infectadas com o patógeno é possível observar a mudança de coloração, neste caso o teste revelou coloração vermelha, indicando presença de ácidos resínicos (Tabelas 1 e 2). De acordo com Jakiemiu (2008), ácidos resínicos são terpenos, diterpenóides considerados fitoalexinas, substâncias antimicrobianas cujo teor é aumentado em resposta à ação de microrganismos ou agentes físicos e químicos sobre as plantas (MATIELLO et al., 1997).

O teste de tricloreto de antimônio (Figura 11) foi positivo para folhas sadias e folhas infectadas (Tabelas 1 e 2). É possível notar que em folhas sadias a coloração aparece nos tricomas glandulares indicando a presença de esteróides nessas estruturas. Em tecidos infectados pelo patógeno observa-se que a coloração vermelho-acastanhado nas regiões da lesão. Fumagali et al. (2008) reporta que esteróides podem atuar como substância de defesa das plantas contra danos ou microrganismos.



Figura 11. Teste histoquímico com tricloreto de antimônio em cortes transversais de folhas de *Mentha spicata*. Nas Figuras A/B: secção transversal de folhas saudáveis; seta: tricomas glandulares com coloração resultante da reação; Figura C: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; seta: coloração indicativa da presença de estereóide no mesofilo; D: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; seta: urédia. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste do ácido sulfúrico/ glicerina foi negativo para folhas saudáveis e positivo para folhas infectadas (Tabelas 1 e 2). No teste com folhas infectadas a presença de lactonas sesquiterpênicas foi denunciada pela coloração vermelho acastanhado resultante da reação.

A coloração vermelho-acastanhado foi observada na região da infecção da doença, indicando maior síntese dos compostos em tecidos infectados. As lactonas sesquiterpênicas são reconhecidas como substâncias de grande atividade biológica sendo utilizadas como inseticidas, bactericidas, fungicidas e outros (FREIRE, 2004).

O teste da vanilina clorídrica foi negativo em ambos os casos (Tabelas 1 e 2).

O teste de lugol foi negativo tanto para folhas sadias como para folhas infectadas (Tabelas 1 e 2). Não houve a indicação de amidos presentes no mesofilo das folhas.

Para o teste do azul brilhante de comassie em *M. spicata* o teste foi positivo em ambos os casos (Tabelas 1 e 2). É possível observar que as células da epiderme e sistema vascular apresentam coloração azul, indicando presença de proteínas em tais tecidos. Da mesma forma tecidos lesionados apresentaram a mesma coloração em tecidos da epiderme, indicando a presença de proteínas. O teste não indica especificidade da síntese de destinada na defesa da planta.

#### **4.1.4 Avaliação Histoquímica de *M. suaveolens* infectadas por *P. menthae***

O teste de sudan III (Figura 12), para identificação de lipídeos totais foi positivo para esse reagente em todos os casos (Tabelas 1 e 2). Pode-se observar uma grande massa de urediniósporos reunida e logo abaixo da colônia há desuniformidade de distribuição das moléculas de lipídeos no perfil do mesofilo. A coloração vermelha do reagente encontra-se junto aos fungos, indicando a presença de lipídeos totais na base da colônia. Fungos podem utilizar lipídios como fonte de energia para o seu desenvolvimento.

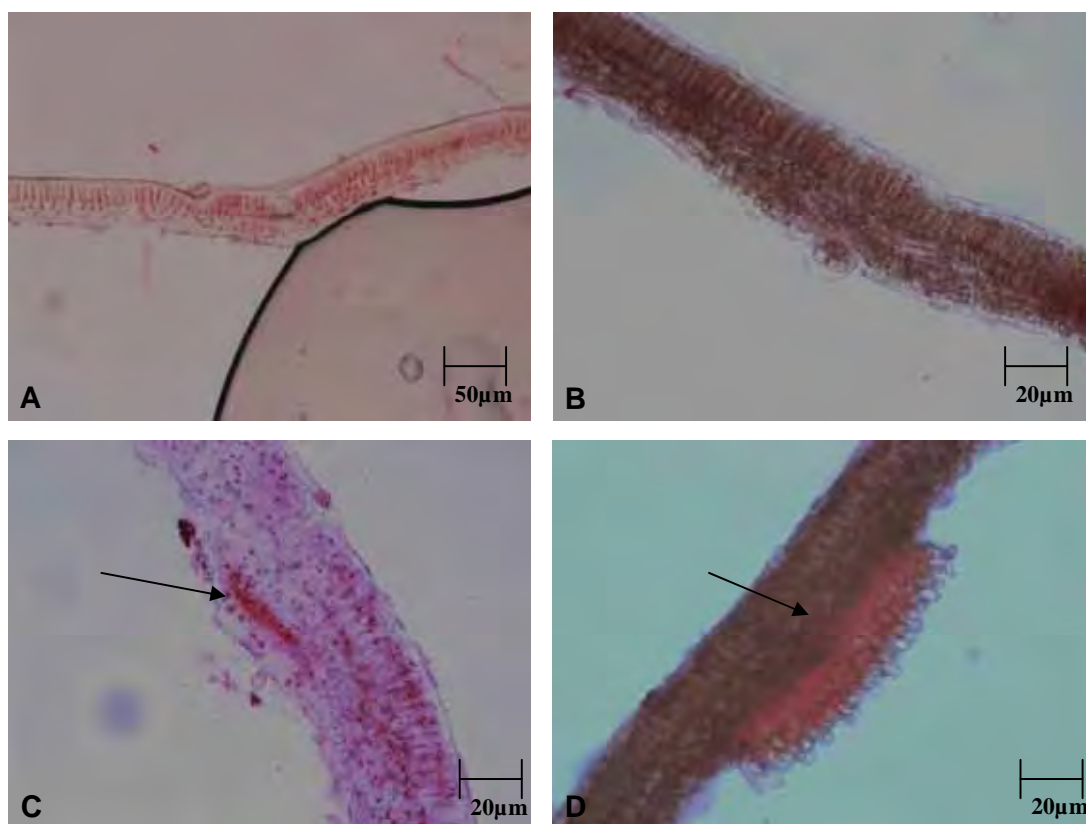


Figura 12. Teste histoquímico com sudan III em cortes transversais de folhas de *Mentha suaveolens*. Figuras A/B: secção transversal de folhas sadias; C: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; seta: o acúmulo da coloração vermelha na base da colônia; D: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; seta: urédia. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste com sulfato azul do nilo em folhas sadias e folhas afetadas foi positivo (Tabelas 1 e 2). É possível observar a coloração azul em células da epiderme e coloração rosa nos tricomas glandulares, essas colorações indicam presença de lipídeos ácidos (coloração azul) e lipídeos neutros (coloração rosa).

O teste do reagente de NADI foi negativo (Figura 13). Não é possível identificar coloração azul para essências nem coloração vermelha para ácidos resínicos (Tabelas 1 e 2). Quando o teste foi feito em folhas infectadas foi possível observar coloração vermelho-escuro nas regiões afetadas pelo patógeno, com a presença de urediniósporos, indicando a produção de ácidos resínicos em resposta à infecção na planta.

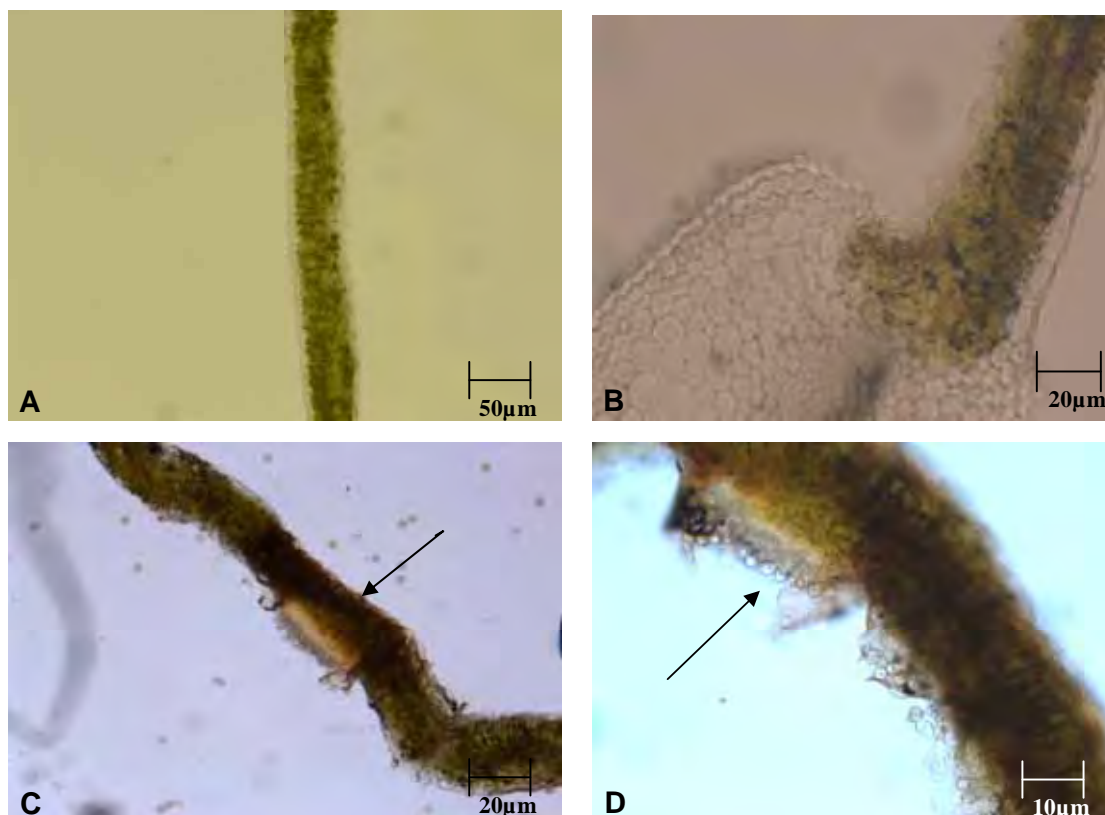


Figura 13. Teste histoquímico com reagente de NADI em cortes transversais de folhas de *Mentha suaveolens*. Figuras A/B: secção transversal de folhas saudáveis; C/D: secção transversal de folhas infectadas com *P. menthae*; em destaque em C, coloração resultante da reação (seta); em destaque em D: urédias formadas pelo fungo. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste para tricloreto de antimônio foi positivo (Tabelas 1 e 2). As colorações vermelho-alaranjado permaneceram nos tricomas glandulares, indicando a presença de esteróides nesses tecidos. Em folhas infectadas pelo patógeno é possível notar que a coloração vermelho-alaranjado ganha intensidade em tecidos infectados, indicando maior síntese de esteróides em tecidos lesionados pela doença. Esteróides podem ser utilizados pela planta como sistema de defesa possuem função de interação com outros organismos no sistema planta-ambiente (CARVALHO et al., 2009).



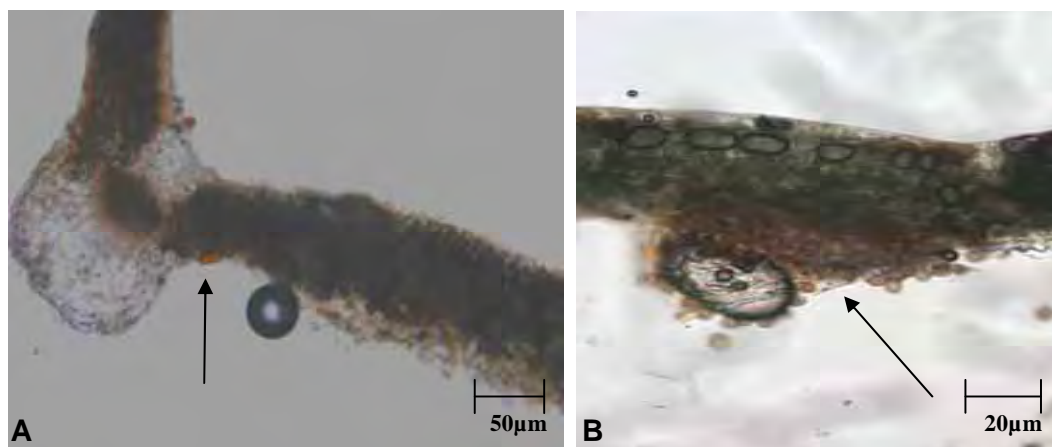


Figura 14. Teste histoquímico com tricloreto de antimônio em cortes transversais de folhas de *Mentha suaveolens*. Figuras A: secção transversal de folha sadias; seta: (seta) tricoma glandular indicando presença de esteróides; B: secção transversal de folhas infectadas por *P. menthae*; seta: (seta) urédias do fungo. Foto: Danila Conceição (2009).

O teste ácido sulfúrico/ glicerina (Figura 14) indicou coloração amarela intensa apenas em tricomas glandulares, portanto foi negativo para folhas sadias (Tabelas 1 e 2). Em folhas infectadas as regiões de ocorrência da infecção pelo patógeno resultaram em coloração vermelho-acastanhado indicando que pode haver maior síntese de lactonas sesquiterpênicas em função da colonização dos fungos, de acordo com Carvalho et al. (2009) esses compostos possuem forte atividade citotóxica e estão ligadas com o sistema de defesa das plantas.



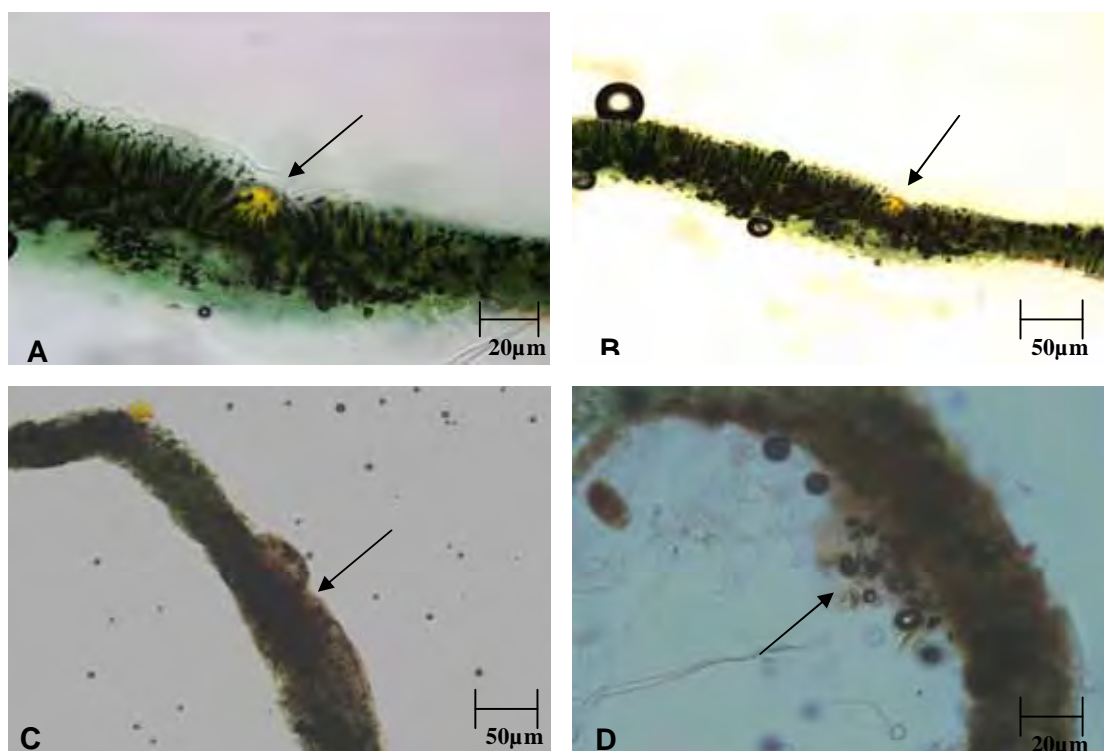


Figura 15. Teste histoquímico com ácido sulfúrico/ glicerina em cortes transversais de folhas de *Mentha suaveolens*. Figura A/B: secção transversal de folha sadia; seta: coloração amarelo intensa em tricomas glandulares; C: secção transversal de folhas infectadas; seta: a colônia de fungos e no mesofilo a coloração indicativa da presença de lactonas sesquiterpênicas; D: secção transversal de folhas infectadas; seta: urédia do fungo. Foto: Danila Conceição (2009)

O teste da vanilina clorídrica foi negativo tanto em folhas sadias como em folhas infectadas fato que indicou a ausência de taninos nas folhas (Tabelas 1 e 2).

O teste de lugol foi positivo (Tabelas 1 e 2), acusou a presença de amidos de coloração arroxeada em células epidérmicas de folhas sadias. Em folhas infectadas o teste foi negativo indicando a ausência de tais moléculas na folha. É notória a desestruturação da epiderme e ausência da coloração para o teste de amidos. Amidos podem servir de fonte de nutrientes para o desenvolvimento do patógeno, a ausência da coloração pode indicar consumo deste composto pelo fungo. Penariol et al. (2008) trabalhando com diferentes tipos de meio de cultura concluiu que meios ricos em amidos são fontes adequadas de carbono para o crescimento micelial em fungos.

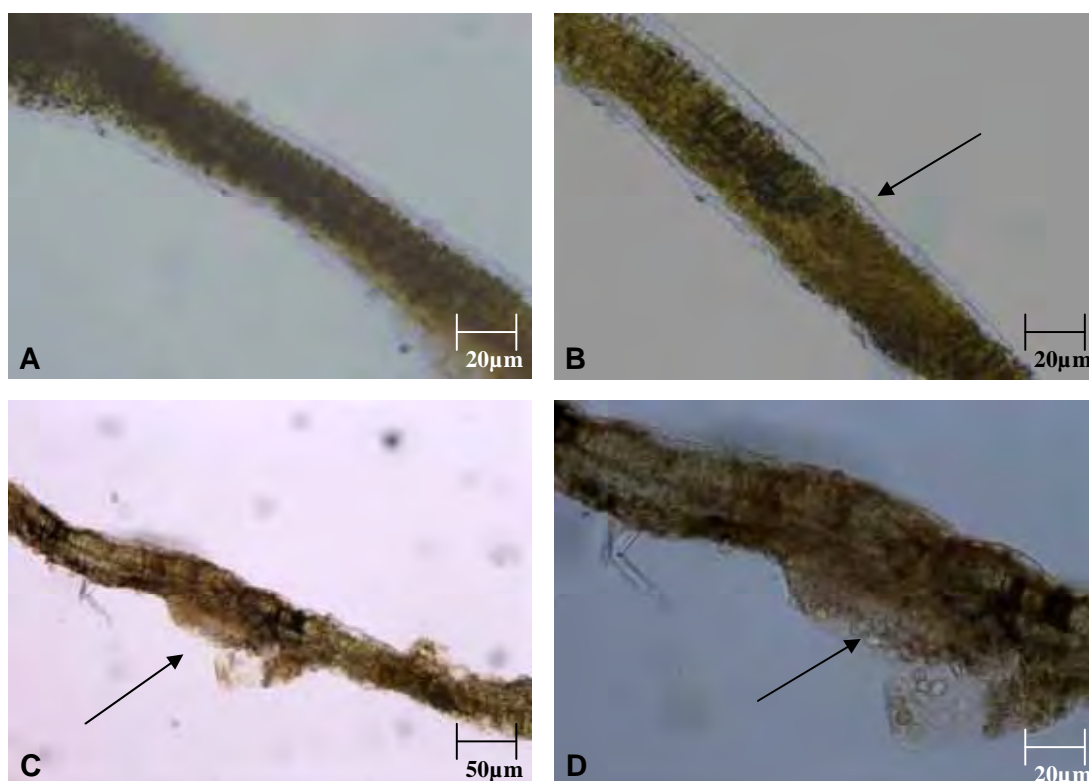


Figura 16. Teste histoquímico com lugol em cortes transversais de folhas de *Mentha suaveolens*. Figura A/B: secção transversal de folha sadia; seta: a coloração roxa em células da epiderme; C/D: secção transversal de folhas infectadas; seta: urédia do fungo. Foto: Danila Conceição (2009)

O teste do azul brilhante de comassie foi positivo tanto em folhas afetadas como em folhas sadias (Tabelas 1 e 2). Os tecidos sadios e afetados pelo fungo apresentaram coloração azul, indicando a presença de proteínas em todo o mesofilo nas folhas sadias.

Nos testes histoquímicos o sudan III, foi positivo em todas as espécies independentemente se lesionadas ou não (Tabelas 1, 2 e 3). Se comparadas folhas colonizadas por *E. biocellata*, ambas as espécies *M. piperita* e *M. arvensis*, não mostraram diferenças na composição dos lipídios na secção transversal. Em ambos os casos, a coloração vermelha foi uniforme em toda a secção, indicando que os fungos não mobilizaram o lipídio da planta para consumo. Ao contrário do ocorrido com as espécies colonizadas por *P. menthae*, *M. arvensis*, *M. spicata* e *M. suaveolens* sendo

possível observar mobilização da coloração vermelha na base da colônia, e desuniformidade de distribuição de lipídios totais na secção transversal se comparadas às folhas sadias. Como afirmado por Agrios (2005) lipídios ocorrem em todas as células, e principalmente na constituição das membranas celulares. Muitos patógenos são capazes de degradar lipídios e o utilizam diretamente como fonte de energia. Dessa forma a mobilização dos lipídios pode ser um indício de fonte energética do fungo neste caso.

O teste de sulfato azul do nilo foi positivo nas espécies *M. piperita* e *M. arvensis*, infectadas por *E. biocellata* para lipídios ácidos (coloração azul) tanto em folhas sadias como para folhas infectadas (Tabelas 1, 2 e 3). Nota-se que em folhas sadias ocorre a presença da coloração rosa indicando que o teste foi positivo para lipídios neutros em tricomas glandulares (Tabelas 1), ausente em folhas infectadas (Tabelas 2 e 3). Lipídios fazem parte da estruturação de membranas de células animais e vegetais, sendo assim podem ser usados como fonte de energia para fungos (AGRIOS, 2005). Nas espécies *M. arvensis*, *M. spicata* e *M. suaveolens* colonizadas por *P. menthae*, o mesmo acontece não há ocorrência de lipídios neutros em espécies infectadas com a doença, indicando possível consumo destes pelos patógenos.

O teste com reagente de NADI foi negativo para ácidos resínicos e essências em todas as espécies sadias (Tabelas 1, 2 e 3). Nos casos de espécies infectadas pelos fungos o teste foi positivo para resinas (Tabelas 3 e 4). Todas as espécies apresentaram coloração vermelha na secção transversal, no caso de *M. arvensis* colonizada por *E. biocellata*, a coloração aparece nas células da epiderme da folha. Em *M. arvensis*, *M. spicata* e *M. suaveolens* infectadas com *P. menthae*, a coloração vermelha apresentava-se no local da lesão.

De acordo com Jakiemi (2008), ácidos resínicos são terpenos, diterpenóides considerados fitoalexinas, substâncias antimicrobianas cujo teor é aumentado em resposta à ação de microrganismos ou agentes físicos e químicos sobre as plantas. Resinas possuem papel defensivo nas plantas, possuem rápida deposição em células epidérmicas, espaços intercelulares e interior das células formando uma barreira impenetrável e envolvendo o patógeno (AGRIOS, 1997).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), o estímulo de patógenos ou insetos levam a uma resposta bioquímica que reduz a aceitabilidade do tecido ou órgão aos ataques, e a produção de fitoalexinas indica a reação da planta ao ataque. Compostos derivados do metabolismo secundário de plantas, como terpenóides, óleos essenciais, fenóis, alcalóides, entre outros podem ser responsáveis pelo efeito medicinal ou tóxico das plantas e ainda pelos efeitos de atração de polinizadores e defesa química (DI STASI, 1995)

No teste de tricloreto de antimônio o resultado foi positivo tanto para folhas saudias como para folhas infectadas com ambos os patógenos (Tabelas 1, 2 e 3). As espécies *M. arvensis*, *M. spicata* e *M. suaveolens* apresentaram coloração vermelho-alaranjado em folhas saudias em tricomas glandulares. Quando as espécies foram colonizadas por *P. menthae* ou *E. biocellata* (no caso de *M. arvensis*) o teste revelou que houve coloração dos tecidos infectados pelo patógeno. A presença de esteróides em áreas próximas às lesões pode indicar uma reação da planta ao ataque do patógeno.

Estas substâncias possuem função de interação com outros organismos e podem agir como proteção contra outros organismos, fatores pós-formados podem estar ausentes ou presentes em baixos níveis, e podem ser ativados após a infecção (papilas, halos, lignificação, tiloses, fitoalexinas, entre outros), neste caso tais substâncias aumentam rapidamente de nível sobre a infecção e são importantes na defesa das plantas contra os patógenos (PASCHOLATI & LEITE, 1995; AGRIOS, 2005; FUMAGALI, et al., 2008; CARVALHO et. al., 2009). Em *M. piperita* colonizada por *E. biocellata* o teste foi positivo em tricomas glandulares, as áreas atacadas pelo patógeno permaneceram com a mesma coloração, este pode ser um indicativo de suscetibilidade da planta ao patógeno.

O teste de ácido sulfúrico/ glicerina foi negativo em todos os casos de folhas saudias (Tabela 1). Em todas as espécies tanto para folhas infectadas com *P. menthae* como espécies infectadas por *E. biocellata*, o teste foi positivo (Tabelas 2 e 3). Neste caso as folhas apresentaram nos locais de lesão ou infecção coloração vermelho-acastanhado, indicando uma reação da planta à presença de patógenos. Tais substâncias estão ligadas à atividade biológica, possuem amplo espectro de ação, são

fortemente citotóxicas, dessa forma podem fazer parte do sistema de defesa da planta, podem estar presentes na planta em níveis baixos, quando ocorre a infecção fitoalexinas, entre outras substâncias são ativadas e sintetizadas em maiores níveis (PASCHOLATI & LEITE, 1995; FREIRE, 2004; ARANTES, 2007; CARVALHO, et al. 2009).

O teste da vanilina clorídrica foi negativo em todos os casos (Tabelas 1, 2 e 3), tanto para folhas sadias como para folhas lesionadas. Os taninos, substâncias reveladas em vermelho pelo teste, são utilizadas pela planta como sistema de defesa contra outros microrganismos, especialmente contra insetos, pois possui baixa palatabilidade e tem efeito adstringente, podem ser condensados e hidrolizáveis, sendo que os hidrolizáveis seriam responsáveis pela ação contra herbivoria de insetos e os taninos condensados responsáveis pela defesa da planta contra microrganismos (ZUCKER, 1993; YAMADA, 2004).

O teste do lugol foi negativo em todos os casos (Tabelas 1, 2 e 3) exceto em folhas sadias de *M. suaveolens*, quando infectadas, folhas lesionadas obtiveram resultado negativo (Tabelas 2 e 3) indicando consumo do amido pelos fungos. Tais fatores podem estar ligados à variabilidade genética entre as espécies utilizadas. Cultivares da mesma espécie pode apresentar diferentes reações bioquímicas, indicando diferenças na interação com microrganismos, ou seja, podem inferir resistência (SILVA et al., 2005b). Amidos são geralmente substâncias de reserva, mobilizados pela ocorrência de hidrólise ou fosforilação direta de resíduos de glicose terminais (DORES, 2007).

O teste para o azul brilhante de comassie foi positivo para todos os casos (Tabelas 1, 2 e 3), o teste não indicou diferença de coloração entre as espécies, e também entre folhas sadias e lesionadas. Este teste indica presença de proteínas, porém não há especificidade na identificação do tipo de proteína utilizada pela planta como defesa.

Mudanças na bioquímica da planta durante o processo de cultivo e produção podem estar intimamente ligadas aos seus efeitos medicinais. A grande variabilidade na composição química da planta resulta de fatores à que elas estão expostas durante seu crescimento, armazenamento e manipulação (ZUIN & VILEGAS, 2000). A expressão genética pode sofrer modificações resultantes da interação de

processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. O acréscimo de metabólitos secundários resultantes de ataque de insetos e patógenos pode ser uma resposta restrita ao órgão danificado, porém pode também ser uma resposta geral, afetando toda a bioquímica vegetal (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A exposição das plantas à *P. menthae* e *E. biocellata* modificou a bioquímica de forma a sintetizar substâncias responsáveis pelo seu sistema de defesa, mas que, não necessariamente, sejam princípios ativos de interesse econômico medicinal. Zechini d'Aulerio et al. (1995) mostraram que a composição do óleo essencial, resultante de folhas infectadas com a ferrugem, é modificada fornecendo menos mentol, reduzindo assim o valor de mercado do produto final.

#### **4.2 Aspectos anatômicos de *M. piperita*, *M. spicata*, *M. suaveolens* e *M. arvensis* infectadas por *P. menthae* e *E. biocellata***

Folhas sadias de *M. piperita* para o teste de azul de toluidina que a organização dos tecidos constitui-se de células da epiderme em camada unisseriada, são células geralmente poliédricas, curtas ou alongadas, de paredes anticlinais retas ou sinuosas, as paredes periclinais são espessas revestidas pela cutícula, assim como folhas de *M. piperita* descritas por SOUZA (2003). Logo abaixo aparecem as células do parênquima paliçádico formado de células alongadas em secção transversal do mesofilo e diminuem de tamanho à medida que se aproximam do centro. Na face abaxial o tecido é constituído de parênquima lacunoso disposto de forma descontínua no mesofilo, concordante com a descrição realizada por Apezato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2006). Também é possível notar a presença de tricomas glandulares na face abaxial.

Quando infectadas por *E. biocellata*, não se observou desorganização das células epidérmicas dos tecidos, por onde pode ocorrer a infecção, em ambas as faces. De acordo com Agrios (2005) e Dickison (2000) a penetração dos fungos em plantas pode ocorrer de diversas formas tanto por aberturas naturais como abertura estomática, hidatódios ou lenticelas ou ainda por penetração direta dos haustórios do patógeno. Oídios formam haustórios no interior das células do hospedeiro, sem matá-lo. Caracteriza-se pela formação de fina camada de micélio na superfície

foliar formando colônias, sendo que estas formam haustórios que retiram os nutrientes mesmo de células mais distantes. A massa micelial formada na superfície da folha apresenta filamentos bastante finos do patógeno formando uma grande massa branca sobre a folha como descritos por Stadink e Mazzafera (2001).

Na secção transversal de *M. arvensis* em corante azul de toluidina nota-se que a espécie apresenta tricomas tectores de tamanhos variados, multi ou unicelulares e tricomas glandulares em toda camada superficial da folha, típicos da espécie. Bonzani et al. (2007) também observou tais características estudando os aspectos anatômicos de mentas. A epiderme é constituída de células unisseriadas de paredes periclinais espessadas que formam epiderme e logo abaixo, encontra-se o parênquima paliçádico, na face adaxial, com células unisseriadas alongadas e unidas.

O parênquima lacunoso, na face abaxial, constitui-se de células de diferentes formatos e estão dispersos no mesofilo, onde estão localizadas as cavidades estomatais, em maior frequência. O tecido colonizado apresenta desorganização das células epidérmicas na face abaxial da folha, além de desestruturação do parênquima lacunoso em virtude da colonização dos tecidos. Segundo Agrios (2005) tal fato pode ser explicado por ocasião da ocorrência de aberturas naturais da folha, como a abertura estomatal, os hidatódios ou ainda ferimentos mecânicos ou causados por insetos.

Quando infectadas por *E. biocellata*, as hifas formadas são menores e mais finas, os esporos não formam colônias aglomeradas e não desestruturam de os tecidos de forma severa. As hifas estão presentes em toda superfície foliar, caracteriza-se pela presença da massa branca formada nas faces abaxial e adaxial das folhas, visíveis a olho nu.

A espécie *M. spicata* apresenta parênquima paliçádico em camada unisseriada com células longas na face adaxial, na face abaxial o parênquima é lacunoso disposto de forma descontínua, onde estão localizadas as cavidades estomáticas e os estômatos, a epiderme é unisseriada contém pelos glandulares simples unicelulares em ambas as superfícies, distribuídos aleatoriamente na superfície da folha assim como observado por Bonzani et al. (2007).

Nos sistemas vasculares, constituídos de vasos de xilema e floema existe modificação na organização das células, as células da epiderme ficam mais arredondadas e compactadas, há formação da bainha do feixe, constituído de parênquima paliçádico com camadas de células multisseriadas, confirmado por Souza (2003).

Em folhas colonizadas pelo patógeno *P. menthae* há desestruturação das células da epiderme.

Na espécie *M. suaveolens* a epiderme é constituída de camada de células unisseriadas contendo na superfície pêlos glandulares simples unicelulares tanto na face abaxial como na face adaxial e concordante com Bonzani et al. (2007), estão distribuídos aleatoriamente na superfície da folha. Logo abaixo da epiderme localizam-se células parenquimáticas do tipo paliçádico, em camada unisseriada, de células alongadas, dispostas na face adaxial. É possível observar células parenquimáticas do tipo lacunoso na face abaxial, disposto de forma descontínua, onde estão localizadas as cavidades estomáticas e os estômatos. Nas nervuras localizam-se os vasos condutores compostos pelo xilema e floema, nesta região há formação da bainha do feixe vascular, formado por camadas (duas a três) de células parenquimáticas, também descritos por Souza (2003).

Em folhas colonizadas por *P. menthae* existe desestruturação da epiderme da folha. Por ser o primeiro tecido no qual há o contato com os esporos e penetração do patógeno, claramente a penetração ocorreu na face abaxial onde se localizam aberturas naturais das folhas. De acordo com Agrios (2005), a penetração pode ocorrer tanto por aberturas naturais, como abertura estomática, hidatódios ou ainda por ferimentos ocasionados por alguma injúria física. A epiderme das folhas é geralmente coberta por uma camada de cera (cutina) com função de proteção, essa camada pode ser penetrada pelos fungos por força mecânica, ou ainda por lise enzimática, alguns fungos sintetizam enzimas capazes de degradar a cutina, principal componente da cutícula e assim facilitar a infecção (AGRIOS, 2005).

No caso de mentas infectadas a massa de uredinióporos empurra as células epidérmicas para fora, abrindo-as e expondo a massa de esporos, ocorre desestruturação do parênquima lacunoso e epiderme.



Do ponto de vista anatômico todas as espécies utilizadas são semelhantes quanto à organização dos tecidos. Apresentaram tecido epidérmico contendo células epidérmicas bem definidas, unisseriadas, em ambas as faces da folha, as paredes periclinais são mais espessadas, formando a cutícula, concordantes com Souza (2003). Em todos os casos as espécies apresentaram apêndices (tricomas glandulares e tectores). Martins e Martins (2003) indicaram a presença de tricomas glandulares abundantes em ambas as faces de *M. spicata*. Em *M. arvensis* os tricomas tectores pluricelulares são bem definidos e de tamanhos variados, em distribuição variada na superfície da folha nas faces abaxial e adaxial, Bonzani et al. (2007) também identificaram tais tricomas confirmando sua abundância em *M. arvensis*.

Todas as espécies apresentaram parênquima paliçádico logo abaixo da epiderme, em células longas e unidas, perpendiculares ao mesofilo, além de parênquima lacunoso na face abaxial da folha. A região dos feixes vasculares é composta de camada multisseriada de células parenquimáticas (uma ou duas camadas), envolvendo xilema e floema, também observado por Souza (2003).

Quando colonizadas por *E. biocellata*, tanto *M. piperita* quanto *M. arvensis*, não apresentaram desestruturação da epiderme, a colonização pelo fungo ocorre em hifas muito finas. De acordo Bedendo (1995b) oídios são fungos parasitas obrigatórios, porém convivem com a planta durante todo o ciclo de vida da mesma, possuem dessa forma parasitismo refreado, alta especificidade na relação patógeno-hospedeiro. Neste caso, o patógeno coloniza tanto a face abaxial como face adaxial das folhas. Juronis e Snieškienė (2004), constataram oídios (*Erysiphe biocellata*) em plantas de menta (*M. piperita* e *M. arvensis*), identificando-as como as espécies de menta menos resistentes para a infecção de doenças fúngicas.

Nos casos de infecção por *P. menthae* em *M. arvensis*, *M. spicata* e *M. suaveolens*, o ataque mais severo nos tecidos vegetais da folha. Em todos os casos a infecção inicial ocorre na face abaxial, no parênquima lacunoso, ocasionando sua desestruturação. Mussury et al. (2007) observou a desestruturação das células epidérmicas em folhas de soja lesionadas por *Phakopsora pachyrhizi*, formando a urédia e expondo os uredinióporos.

A infecção ocorre preferencialmente na face abaxial das folhas, e é visível na face adaxial pela formação de halos amarelos que evoluem em necrose dos tecidos como descrito por SANTOS et al. (2005).

Comparativamente o ataque do patógeno ocorre da mesma maneira em todas as espécies, não é possível observar a formação de compartimentalização dos tecidos próximos à lesão, exceto em *M. suaveolens*, onde ocorre o escurecimento de tecidos próximos à lesão, segundo Dickinson (2000) uma resposta anatômica às infecções e ferimentos na planta é formar uma parede na região infectada a fim de conter os danos em uma pequena área dentro de um único tecido, restringindo o movimento do patógeno.

#### **4.3 Controle da germinação *in vitro* de *Puccinia menthae* e *Erysiphe biocellata***

Os tratamentos, incluindo os óleos essenciais de palmarosa, cravo, eucalipto e limão (Tabela 4), não diferiram significativamente entre as concentrações apresentadas tanto para *E. biocellata* como para *P. menthae*, bem como também não diferiram significativamente do padrão químico (Mancozeb). Dessa forma foi possível obter controle satisfatório da germinação dos esporos se comparados aos resultados obtidos com o uso do controle químico e da testemunha.

De acordo com Fiori et al. (2000) o uso do óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*) resultou em completa inibição da germinação dos esporos de *Didymella bryoniae* em alíquotas de 20 µL de óleo essencial. Salgado et al. (2003) obtiveram resultados positivos utilizando *C. citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla* no controle de *F. oxysporum*, *B. sorokiana* e *B. cinerea*, entretanto a espécie que resultou em maior inibição do crescimento micelial foi *E. urophylla*, no qual o autor constatou a presença de globulol no óleo essencial, composto inexistente nos óleos essenciais das espécies *C. citriodora* e *E. camaldulensis*. No presente estudo pode-se associar a ação antifúngica do óleo essencial de *C. citriodora* ao citronelal, composto majoritário do óleo (ABREU, 2006).

Tabela 4. Porcentagem de esporos germinados de *P. menthae* e *E. biocellata* na presença dos óleos essenciais:

Germinação de Esporos (%)			
<i>E. biocellata</i>		<i>P. menthae</i>	
Tratamentos	Germinação	Tratamentos	Germinação
Testemunha	68 a	Testemunha	95 a
Limão/ 0,01	13,75 b	Limão/ 0,01%	54 b
Limão/ 0,02%	9,75 bc	Limão/ 0,02%	15 c
Limão/ 0,03%	8,25 dbc	Cravo 0,04%	6 d
Limão/ 0,04%	7,5 dbc	Eucalipto/ 0,02%	3,5 d
Eucalipto/ 0,01%	6,25 dbc	Eucalipto/ 0,01%	4,5 d
Eucalipto/ 0,02%	1,25 dc	Palmarosa/ 0,01%	5,5 d
Eucalipto/ 0,04%	1 dc	Cravo 0,01%	3 d
Eucalipto/ 0,03%	0,5 dc	Limão/ 0,03%	3 d
Cravo/ 0,02%	0,25 c	Eucalipto/ 0,03%	3 d
Palmarosa/ 0,02%	0 d	Palmarosa/ 0,02%	2 d
Palmarosa/ 0,01	0 d	Cravo/ 0,03%	2 d
Mancozeb	0 d	Eucalipto/ 0,04%	2 d
Palmarosa/ 0,03%	0 d	Cravo/ 0,02%	1,5 d
Cravo/ 0,03%	0 d	Mancozeb	1 d
Cravo/ 0,04%	0 d	Limão/ 0,04%	1d
Palmarosa/ 0,04%	0 d	Palmarosa/ 0,03%	1 d
Cravo/ 0,01%	0 d	Palmarosa/ 0,04%	0,5 d
CV (%)	56,12	CV (%)	26,12

CV (Coeficiente de Variação); Médias de mesma letra na coluna não diferem entre si. Tuckey a 5% de probabilidade.

Rozwalkai et al. (2008) verificaram a ação fungitóxica do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Synzygium aromaticum*) sobre os patógenos *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* constatando a inibição do crescimento micelial dos fungos em 100%. Verificaram também os efeitos do óleo essencial do cravo-da-Índia e do decocto de laranja (*Citrus sinensis*), os quais obtiveram grande potencial de inibição do crescimento micelial de *G. cingulata* e *C. gloeosporioides*, respectivamente. Tal estudo corrobora com o presente trabalho que demonstrou que o

óleo essencial de cravo (*S. aromaticum*) inibiu a germinação dos esporos de ambos os patógenos, não diferindo estatisticamente do mancozeb.

De acordo com a tabela 4, o óleo essencial de *Cymbopogon martini* mostrou eficiência, inibindo 100% da germinação de esporos de *E. biocellata* e eficiência na inibição de germinação dos esporos de *P. menthae*. Carvalho et al. (2008) confirmaram a ação fungitóxica do extrato bruto de *C. martinii* além de testar o extrato aquoso de *C. citriodora* em fungos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Constatado também por Médici et al. (2007), os quais testaram o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* sobre *Phakopsora pachyrhizi* na inibição da germinação dos urediniósporos, obtendo 100% de inibição em todas as concentrações. Utilizou também óleo essencial de *C. citriodora* obtendo resultados similares. Fiori et al. (2000) constataram inibição completa da germinação de esporos de *D. bryoniae* quando o tratamento continha *Cymbopogon citratus* e *C. citriodora*, na concentração mais baixa 20 µL.

Os resultados obtidos por Wilson et al. (1997) corroboram com presente trabalho, pois mostraram os efeitos fungitóxicos do óleo essencial de *C. martini*, a qual indicou maiores inibições nas menores concentrações sobre esporos de *B. cinerea*. Mostraram inibição completa em diluição de 0,78% após 40 horas de incubação. Segundo Velluti et al. (2004) o óleo essencial de palmarosa contém linalol, cariofileno, geraniol, geranil acetato, 3-careno, possui atividade fungitóxica contra fungos do gênero *Fusarium* e mostrou efeitos nas concentrações 500 mg. kg<sup>-1</sup> e 1000 mg. kg<sup>-1</sup> milho.

O óleo essencial de limão nas concentrações de 0,01% e 0,02% não apresentou controle eficiente da germinação dos esporos, no entanto foram significativamente diferentes da testemunha e do padrão químico (Tabela 1). A eficácia do óleo essencial na inibição foi proporcional com o aumento da concentração deste no meio de cultura. As concentrações 0,03% e 0,04% não apresentaram diferenças significativas entre si e com o padrão químico, de acordo com Pereira et al. (2006) o aumento da concentração dos óleos essenciais no meio inibe proporcionalmente a germinação e o crescimento micelial dos fungos, em alguns casos o aumento da concentração pode estimular o crescimento micelial ou a germinação de esporos, neste caso o desenvolvimento dos fungos deve ser estudado com maior rigor, assim como os

óleos essenciais utilizados como inibidores. No presente estudo não foi observado o estímulo da germinação dos esporos.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível verificar a síntese de alguns compostos do metabolismo secundário das plantas em função do ataque de fitopatógenos utilizando-se técnicas histoquímicas. Pode-se afirmar que plantas defendem-se contra situações adversas ativando defesas pré-existentes em seu sistema metabólico, de modo a formarem barreiras físicas e bioquímicas que retardarão a infecção pelo patógeno. Em outros casos, quando comparadas anatomicamente, é possível notar que diferentes espécies de plantas possuem maneiras distintas de reagir quando atacadas por diferentes patógenos como é o caso do oídio (*E. biocellata*) e da ferrugem (*P. menthae*). Algumas doenças atingem de forma severa o hospedeiro, como é o caso da ferrugem, outras são menos prejudiciais, possibilitando longa estadia em seu hospedeiro sem causar sua morte, como é o caso do oídio.

A diferença genética entre espécies possibilita verificar a suscetibilidade das plantas aos diferentes patógenos. Neste caso a suscetibilidade pode estar ligada às condições climáticas e variabilidade genética;

Em alguns casos, testes histoquímicos complementares devem ser realizados em função da especificidade de cada um dos compostos sintetizados pelas plantas, como é o caso do reagente azul brilhante de comassie, que identifica proteínas.

Este reagente não diferencia os tipos de proteínas sintetizadas pela planta ou pelo patógeno, não fornecendo informações precisas que possam contribuir com o estudo. Outros testes também podem ser realizados a fim de identificar outros tipos de compostos ligados ao sistema de defesa da planta.

O controle *in vitro* utilizando óleos essenciais de plantas medicinais foi viável para ambos os patógenos. Deve-se, no entanto, considerar testes futuros em campo a fim de viabilizar economicamente a alternativa de controle das doenças e verificar sua relação junto à fatores climáticos a que as plantas estarão expostas.

## 6. CONCLUSÕES

- As espécies *M. piperita*, *M. spicata*, *M. arvensis* e *M. suaveolens* possuem sistema de defesa contra fitopatógenos. Sintetizaram compostos do metabolismo secundário, ativando fatores pré-existentes nas plantas, responsáveis pelo seu sistema de defesa;
- Plantas atingidas por *P. menthae* sintetizaram compostos responsáveis por sua defesa;
- Quando infectadas por *E. biocellata*, as espécies *M. piperita* e *M. arvensis*, não responderam de forma drástica devido ao tipo de infecção pelo qual o patógeno colonizou as plantas;
- Anatomicamente nenhuma das espécies apresentou compartimentalização dos tecidos infectados, indicando que as defesas bioquímicas foram as mais utilizadas;
- Os óleos essenciais foram eficientes no controle *in vitro* dos patógenos. O óleo essencial de *Citrus limonum*, tanto em *P. menthae* como em *E. biocellata*, foi menos eficiente na dose avaliada, sugerindo doses acima de 0,03% e 0,04%.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agronomia (Horticultura), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- AGRIOS, G. N. Control of Plant Diseases, In: **Plant Pathology**, San Diego: Academic Press, 1997, p. 174 - 221.
- AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens, In: **Plant Pathology**, San Diego: Academic Press, 2005, p. 208-248.
- APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**, Viçosa, 2ªed., 2006, 438p.
- ARANTES, F. F. P. **Síntese e avaliação da fitotoxicidade de novas lactonas sesquiterpênicas**. 2007. 136f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- ASCENSÃO, L. **Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado**. Botucatu: IB-UNESP, 2003. 20p. (mimeogr).
- BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos, **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7 n. 2, p. 79-83, 2001.

- BARD, M. et al. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**. Champaign, v. 23, p. 534-538, 1988.
- BEDENDO, I. P. Ferrugens. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia, volume 1: princípios e conceitos**, 3 ed., São Paulo: Agronômicas Ceres, 1995a, 919p.
- BEDENDO, I. P. Oídio. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia, volume 1: princípios e conceitos**, 3 ed., São Paulo: Agronômicas Ceres, 1995b, 919p.
- BETTIOL, W. Controle Alternativo de Doenças na Agricultura Orgânica, **Summa Phytopathologica**, palestras, v.30, n.1, p. 158-160, 2004.
- BONZANI, N. E.; COSTAGUTA, M; BARBOZA G. E. Estudos anatómicos en especies de *Mentha* (Fam. Lamiaceae) de Argentina, **Arnaldoa**, Argentina, v. 14, n.1, p. 77 - 96, 2007.
- BRUGNERA, A.; CARDOSO, D.; BOUERI, M. A.; MALUF, W. R. Cultivo e Propriedades Medicinais da Hortelã, **Boletim Técnico de Hortaliças**, n. 34, 1ª ed. – Departamento de Agricultura – UFLA, 1999.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Cell wall polysaccharides in seeds: structure, metabolism, function and ecological aspects, **Revista Brasileira de Fisiologia Brasileira**, v. 12, p. 137- 162, 2000.
- CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 43, p. 73–79, 1998.
- CAIN, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 88, p. 383-392, 1947.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos, **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3 - São Paulo, 2003.
- CARVALHO, C. A; MATTA, S. L. P.; MELO, F. C. S. A.; ANDRADE, D. C. F.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; SILVA, M. B.; ROSA, M. B. Cipó-cravo (*tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n.1, p. 51-58, 2009.

CARVALHO, J. B.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; CRUZ; M. E. S.; CARLOS, M. M.; STANGARLIN, J. R. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p. 88-93, 2008.

CARVALHO JR., A. A. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2008.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas; descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, p. 180-183, 1995.

CHAGAS, H. A. **Controle de mofo-cinzeno (*Amphobotrys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.) por métodos químico, biológico e com óleos essenciais**. 2009. 67f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Agricultura, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

CZEPAK, M. P. Produção de óleo bruto e mentol cristalizável em oito frequências de colheita de *Mentha*. **Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agrônômica – FCA - Botucatu – SP - 1ª ed.**, v. II, p. 53-80, 1998.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris. Série D**, v. 258, p.1338-1340, 1964.

DICKISON, W. **Integrative Plant Anatomy**, 2000, 533p.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. Ed. UNESP. Brasil, 1995, 230p.

DI STASI, L. C.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M.; HIRUMA LIMA, C. A. Lamiales. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, 2ª ed., São Paulo: Ed. UNESP, 2002, 604p.

DORES, R. G. R. **Histoquímica de *Dimorphandra mollis* Benth.** 2007. 136f. Tese (Doutorado), Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

EDWARDS, J.; PARBERY, D. G.; HALLORAN, G. M.; TAYLOR, P. A. Assessment of infection and sporulation processes of *Puccinia menthae* on peppermint in controlled conditions. **Australian Journal of Agricultural Research**, Australia, v. 50, p. 1273-1278, 1999.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de cinco espécies de eucalyptus cultivados em Goiás, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.2, 2001.

FIORI, A. C. G; SHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STARGALIN, J. R.; VIDA, J. B.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal Activity of Leaf Extracts and Essential Oils of some Medicinal Plants against *Didymella bryoniae*, **Journal of Phytopathology**, Berlin, n.148, p. 483-487, 2000.

FISCHER, D. B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

FUMAGALI, E; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI G. J.; OLIVEIRA A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.4, p. 627-641, 2008.

FREIRE, M. F. I. Plantas medicinais: a importância do saber cultivar, **Revista Científica Eletrônica Agronomia** – ano 3, ed. 5, 2004, 9p.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Gauthier - Paris, Villars. 1969-1970. 2v. 1395p.

GARDINER, P. Peppermint (*Mentha piperita*). **The Longwood Herbal Task Force**, The Center for Holistic Pediatric Education and Research, 2000. Disponível em URL: <<http://www.mcp.edu/herbal/>> Acesso em 15/01/2007.

GARLAND, S. M. **Practical Approaches to the Analyses for Pesticide Residues in Essential Oils** – Rural Industries Research and Development Corporation, n. 4, 2004. Disponível em <<http://www.rirdc.gov.au/reports/EOI/04-109.pdf>>

GEISSMAN, T. A.; GRIFFIN, T. S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid structure determination. **Phytochemistry**, v.10, p. 2475-2485, 1971.

GERSBACH, P. V. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia*. **Annals of Botany**, v. 89, n. 3, p. 255-260, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E. A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technology**, v. 47, p. 205-208, 1972.

HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, n.4, p. 315-319, 2000.

HIGUCHI, C. T. **Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicrobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados**. 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

HOLLAND, P. T.; HAMILTON, D.; OHLIN, B.; SKIDMORE, M. W. Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products, **Pure & Applied Chemistry**, Great Britain, v. 66, n. 2, p. 335-356, 1994.

HORNER, C. E. Disease cycle and control of peppermint rust caused by *Puccinia menthae* Pers. **PhD. Thesis**. Oregon State College, Corvallis, OR, 1954.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado). Pós Graduação de Tecnologia de Alimentos Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408p.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

JOHNSON, D. A. Races of *Puccinia menthae* in the Pacific Northwest and Interaction of Latente period of Mints infected with Rust races. **Plant Disease**, v. 79, n.1, p. 20-24, 1995.

JUNIOR, C. F. C.; SILVA, A. C.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Ocorrência de *Cladosporium* sp. em *Fanacetum parthenium* (L.) Schutz Bip, **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 309-311, 2007.

JUNIOR, T. J. P.; MORANDI, M. A. B.; ZAMBOLIN, L.; SILVA, M. B. Controle alternativo e doenças – Histórico. In: VENZON, M.; JUNIOR, T. J. P.; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 221-246, 2005.

JURONIS, V.; SNIEŠKIENĖ, V. Diversity of phytophagous and pathogens and their damage to mints (*Mentha*), **Medicina**, Kaunas, v. 40, n. 8, p. 779-782, 2004.

KIRK, P. M; CANNON, P. F; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. **Ainsworth & Biby's dictionary of the fungi**. 9 ed. Oxon: CAB INTERNACIONAL, 2001, 655p.

KOIKE, T. S. Powdery Mildew of spearmint caused by *Erysiphe orontii* in California, **Plant Disease**, v.83, n. 4, p. 303-309, 1999.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, v.1, 1997, 198 p.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras, **RAAP**, v. 9, 2001. 41p.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, D. M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**, v. 81, p. 35-39, 1998.

LIMA, C. S. **Doenças Fúngicas em Plantas Medicinais em Lavras – MG**. 2002. 44f. Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

LIMA, C. S.; SOUZA, P. E. de; BOTELHO A. O. Fungos da Família *Pucciniaceae* causadores de ferrugem em plantas medicinais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 499-502, 2004.

LOPEZ, S. E.; RIVERA, M. C. Biología y patología de los oídios. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**, Jaguariúna – SP, Embrapa Meio Ambiente, 2001, 484p.

LORENZETTI, E. R. **Interação patógeno – hospedeiro no patossistema capim limão – ferrugem das folhas e avaliação de ingredientes ativos naturais no controle da doença**, 78f. 2009. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Agronomia- Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2008, 544p.

MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p.1297-1302, 1974.

MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p. 99-108, 1948.

MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Controle Alternativo de Fungos. In: VENZON, M.; JUNIOR, T. J. P.; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 269-293, 2005.

MARTINS, M. G. B. Estudos de Microscopia óptica e de Microscopia Eletrônica de Varredura em Folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* x *suaveolens* (Lamiaceae), **Bragantia**, Campinas, v.61, n.3, p. 205-218, 2002.

MARTINS, M. G. B.; MARTINS, A. R. Caracterização histológica de folhas de *Mentha pulegium* x *spicata* (Lamiaceae), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 33-39, 2005.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das Plantas a Moléstias Fúngicas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p. 161-168, 1997.

MAY, A.; TANAKA, M. A. S.; SILVA, E. H. F. M.; MORAES A. R. A. Ferrugem da *Mentha citrata* no Estado de São Paulo, **Boletim Técnico IAC 202**, Série Tecnologia APTA, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas – SP, 2008, 8p.

MÉDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JÚNIOR R. G. M.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2007.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L. da; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; NETO, E. G.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. **Fungos em Plantas no Brasil** – Brasília – EMBRAPA – SPI/ EMBRAPA - Cenargem, 1998, 569p.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia, **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; SILVA, M. A.; DECIAN, V.; SCALON, S. P. Q.; BARBOSA, E. L. Morfoanatomia de *Glycine max*(L.) Merrill infectadas por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow, **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 459-461, 2007.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia, volume 1: princípios e conceitos**, 3 ed., São Paulo: Agronômicas Ceres, 1995, 919p.

PENARIOL, M. C. ; MONTEIRO A. C.; PITELLI, R. A. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições nutricionais, **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 1907-1913, 2008.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**, 2 ed. Londres, 1960. 99p.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R., COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do Desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p. 731-734, 2006.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G., ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L, SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PONCE, A. G; Del Valle, C. E.; Roura, S. I. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. **Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie**, London, v.37, p. 199-204, 2004.

PUSHPANGADAN, P.; TEWARI, S. K. Peppermint In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**, Cambridge, England, v. 3, 2006, 537p.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cell. In: HALL, G. L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, p. 343-444, 1978.

RODRIGUES, D. Palestra durante Expointer aborda plantas medicinais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, agosto 2007. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007>> Acesso em 23 nov. 2009.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp, **Acta Scientiarum Agrônômica**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 123-127, 2006.

ROZWALKAI, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MAY DE MIO, L. L.; NAKASHIMA, T.; Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p. 301-307, 2008.



RUSSOMANNO, O. M. R.; KRUPPA, P. C.; FIGUEIREDO, M. B. *Oidium asteris-punicea* em plantas de Hortelã-pimenta, **Fitopatologia Brasileira**, n. 30, v.5, p. 551, 2005.

SAHOO, S.; DUTTA, P.K. Selection of high yielding palmarosa genotypes for the growth of palmarosa oil industries in the rural sector. **Indian Perfumer**. Kanpur, v. 26, n. 2-4, p. 41-45, 1982.

SAITO, M. L. As plantas praguicidas: alternativa para controle de pragas na agricultura. **Informativo Embrapa Meio Ambiente**, Meio Ambiente e Agricultura, 2004, 11p.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; SOUZA, J. A.; ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. B. P. Avaliação da Atividade Fungitóxica de Óleos Essenciais de Folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.2, p. 249-254, 2003.

SANTOS, M. M. F. B.; STARGALIN, J. R.; BALBI-PEÑA, M. I.; PASCHOLATI, S. F. Doenças da *Mentha*. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia, v. 2: Doenças das Plantas Cultivadas**, 2005, 475p.

SEAB. **Secretaria da agricultura e abastecimento do Paraná**. Paraná lidera produção de plantas medicinais cultivadas. Disponível em <http://www.seab.pr.gov.br>> Acesso em 23 nov. 2009.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STARGALIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de Extratos Vegetais no Controle de Fungos Fitopatogênicos. **Revista Floresta**, n.30, v.1/2, p. 129-137, 2000.

SHARAPIN, N. Controle de Qualidade de Plantas Mediciniais, Fitofármacos - Descrições farmacopéicas. **Boletim Lawen**, v. 2, n. 3, Santiago – Chile, 2001. Disponível em URL<[http://redec.org/main\\_index.html](http://redec.org/main_index.html) > Acesso em 08 out. 2006.

SCHERER, R. **Extratos vegetais: atividade biológica, composição e aplicação**. 147f. 2008. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2008.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal, **Acta Botanica Brasilica**. n. 19, v. 1, p. 183-194, 2005a.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de

plantas. In: VENZON, M.; JUNIOR, T. J. P.; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 221-246, 2005b.

SILVA, S. R., BUÍTRÓN, X., OLIVEIRA, L. H., MARTINS, M. V. M. **Plantas Medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. IBAMA e Ministério de Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Alemanha, 1998, 61p.

SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. Defesa de plantas contra fitopatógenos, Documentos 250, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, 2008, 49p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G., MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. UFSC, 1999, 1104p.

SOUZA, L. A. **Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula**, Ponta Grossa, Ed. UEPG, 2003, 259p.

SOUZA, S. M. C. PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

STADNIK, M. J.; MAZZAFERA, P. Interações Oídio-hospedeiro. In: *Biologia y patologia de los oídios*. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**, Jaguariúna – SP, Embrapa Meio Ambiente, 2001, 484p.

STARR, H.; KIIGEMAGI, U.; TERRIERE, L. C. Insecticide residues in peppermint and their distillation with peppermint oil. **Agricultural and Food Chemistry**, n.11, p. 482-486, 1963.

SVENDSEN, A. B.; VERPOORTE, R. Chromatography of alkaloids. New York: **Elsevier Scientific Publishing**, 1983, 276p.

TOZZE JR., H. J.; GARCIA JR., MASSOLA JR. Ocorrência de oídio em *Mentha x villosa*, **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 1145-1145, 2006.

URBEN, A. F.; MATTOS, J. K.; MENDES, M. A. S. Fungos associados a manchas em folhas em plantas de uso medicinal no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4. p. 390-394, 1987.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; TURON C.; MARIN, S. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum*

under different temperature and water activity conditions in maize grain, **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, UK, v. 96, p. 716-724, 2004.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p. 915-919, 2005.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; GHAOUTH A. E. L; WISNIEWSKI, M. E. Rapid Evaluation of Plant extracts an Essential oils for Antifungal activity against *Botrytis cinerea*, **Plant Disease**, v. 81, n.2, p.204-210, 1997.

YAMADA, T. Resistência de plantas às pragas e doenças: pode ser afetada pelo manejo da cultura? **Informações agronômicas**, Potafós, n.108, 2004, 42p.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da Moderna Química medicinal**, Universidade o Oeste de Santa Catarina – Chapecó, Ed. Argos, 2001, 713p.

ZANANDREA, I.; JULIANO, D. S.; ANDRÉA, B. M.; JULIANE, L.; VERIDIANA, K. B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 01, p. 16-19, 2004.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C. ; SILVA, C. N. L. *Erysiphe biocellata*, um Novo Patógeno de *Mentha arvensis* no Brasil um Novo Patógeno de *Mentha arvensis* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, n. 28, v.4, p. 449, 2003.

ZECHINI D'AULERIO, A. ; ZAMBONELLI, A.; BIANCHI, A.; ALBASINI, A. Micro morphological and chemical investigation into the effects of fungal diseases on *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L. and *Salvia officinalis* L. **Journal of Phytopathology**, n. 143, p. 179-183, 1995.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, Lancaster, v. 121, n. 3, p. 335-365, 1993.

ZUIN, V. G.; VILEGAS, J. H. Y. Pesticides Residues in Medicinal Plants and Phytomedicines, Review article – Universidade de São Paulo, **Phytoterapy Research**, n.14, p. 73-88, 2000.